DESFERRI-FERRICROCINPRODUKTION BEI ASPERGILLUS VIRIDI-NUTANS DUCKER & THROWER

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

MANFRED KAPPNER
aus Neustadt an der Weinstraße

1978

78 186

DESFERRI-FERRICROCINPRODUKTION BEI ASPERGILLUS VIRIDI-NUTANS DUCKER & THROWER

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

MANFRED KAPPNER
aus Neustadt an der Weinstraße

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Mai 1978

Dekan : Prof. Dr. K.P. Hadeler

1. Berichterstatter : Prof. Dr. H. Zähner

2. Berichterstatter : Prof. Dr. D. Mecke

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die vielen fruchtbaren Diskussionen sowie die großzügige Förderung meiner Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. H. Zähner.

Herrn Prof. Dr. D. Mecke, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Tübingen, möchte ich sowohl für das Interesse an meiner Arbeit als auch für anregende Diskussionen danken.

Frau Dr. H. Anke danke ich für zahlreiche kritische Diskussionen, Herrn Prof. Dr. W.A. König (Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Hamburg) für die rasche Strukturaufklärung des Antibiotikums und Herrn Dr. H.-P. Fiedler für die Reinheitsuntersuchungen des Antibiotikums mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie.

Mein Dank gilt ferner Herrn Dr. A. Hasenböhler für die Einarbeitung in die Fermentationstechnik.

Folgende - im Text nicht näher erläuterte - Abkürzungen wurden verwendet:

C-Ac (g/l)	Kohlenstoffgehalt aus Acetat in Gramm/Liter
C-Glc (g/l)	Kohlenstoffgehalt aus Glucose in Gramm/Liter
cpm	counts per minute
DET	1,4-Dithioerythrit
dpm	decays per minute
E_{436}	Extinktion der Eisen(III)-Sideramin-Komplexe bei 436 nm nach der allgemeinen Sideraminbestimmungsmethode (A)
E^{m}_{436}	Extinktion der Eisen(III)-Sideramin-Komplexe bei 436 nm im modifizierten Sideraminbestimmungsansatz (B)
Fc	Ferricrocin
Fch	Ferrichrom
i (cpm)	incorporation (eingebaute Radioaktivität) in cpm
LSC	Liquid scintillation counter
M (g/l)	Myceltrockensubstanz in Gramm/Liter
N (g/l)	Gesamtstickstoff in Gramm/Liter
$N\text{-}NH_4^+$ (g/l)	Stickstoff aus Ammoniumsalzen in Gramm/Liter
pO_2 (%)	Sauerstoffpartialdruck in Prozenten
rpm	revolutions per minute
S/t (ml/h)	Substratzugabe/Zeiteinheit in Milliliter/Stunde
Sid. (g/l)	Sideramingehalt in Gramm/Liter
t (min)	Meßzeit in Minuten
t (h)	Fermentationszeit in Stunden
t (d)	Fermentationszeit in Tagen
T (^{o}C)	Temperatur in Grad Celsius
v_M (g/l·h)	Zunahme der Myceltrockensubstanz/Zeiteinheit in Gramm/Liter·Stunde
v_{Sid} (g/l·h)	Sideraminbildungsgeschwindigkeit in Gramm/Liter·Stunde
vvm	Volumen Luft pro Volumen Nährlösung pro Minute
w/v	Verhältnis von Gewichts- zu Volumenteilen

Die Bezeichnung der Sideramine erfolgte nach DIEKMANN (1970):

1) Bei Trihydroxamaten bezeichnet der Name der Substanz den Eisen(III)-Komplex.
   Der eisenfreie Ligand wird als Desferri-Verbindung gekennzeichnet.

2) Bei Mono- und Dihydroxamsäuren bezeichnet der Name der Substanz die eisenfreie Form.
   Der Metallkomplex wird in der üblichen Weise benannt.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536519_0091

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	
1.	Chemikalien	5
2.	Mikroorganismen	6
3.	Nährmedien	7
4.	Kulturbedingungen	
4.1.	Sporenkulturen	9
4.2.	Schüttelkolbenversuche	9
4.3.	Fermentation	
4.3.1.	10 l-Fermenter	9
4.3.2.	20 l-Fermenter	9
5.	Untersuchung der Fermentationsproben	
5.1.	Mycelgewichtsbestimmung	10
5.2.	Sideraminbestimmung und Aufarbeitung	
5.2.1.	Quantitative Sideraminbestimmung	10
5.2.2.	Qualitative Sideraminbestimmung	12
5.2.3.	Sideraminaufbereitung	12
5.3.	Glucosebestimmung	12
5.4.	Acetatbestimmung	13
5.5.	Gesamtstickstoffbestimmung nach der Micro-Kjeldahl-Methode	13
5.6.	Bestimmung der Ammoniumionen	13
6.	Meß- und Regelvorgänge am 20 l-Fermenter während der Fermentation	
6.1.	pH-Messung	13
6.2.	pO_2-Messung	13
6.3.	Bestimmung des Luftvolumens	14
6.4.	Sauerstoff- und Kohlendioxidmessung in der Fermenterabluft	
6.4.1.	Sauerstoffmessung	14
6.4.2.	Kohlendioxidmessung	14

		Seite
7.	Bestimmung der Atmungsaktivität bei Aspergillus viridi-nutans	15
8.	Untersuchung des Zellhomogenats von Aspergillus viridi-nutans nach ^{55}Fe(III)-Ferricrocingaben	15
9.	Herstellung des Al(III)-, Ga(III)- bzw. V(III)-Sideraminkomplexes	16
10.	Produktion von Fusigen/Fusarinin - Herstellung von δ-N-Hydroxy-L-ornithin und δ-N-Acetyl-δ-N-hydroxy-L-ornithin	
10.1.	Fusigen/Fusarinin-Herstellung	17
10.2.	δ-N-Hydroxy-L-ornithin	17
10.3.	δ-N-Acetyl-δ-N-hydroxy-L-ornithin	18
11.	Analytische Methoden	
11.1.	Proteinbestimmung	19
11.2.	Aminosäurebestimmung mit Ninhydrin	20
11.3.	Test auf δ-N-Hydroxy-L-ornithin mit 2,3,5-Triphenyltetrazolium-chlorid (TTC)	20
11.4.	Radioaktivitätsmessung	20
12.	Sideraminbiosynthese in vitro	21
13.	Bestimmung der NADH:Sideramin-Oxidoreduktase	23
14.	Isolierung und Charakterisierung einer antibiotischen Aktivität bei Aspergillus viridi-nutans	
14.1.	Isolierung	23
14.2.	Biologische Charakterisierung des Antibiotikums	
14.2.1.	Plattendiffusionstest	24
14.2.2.	Verdünnungsreihentest	25
14.3.	Physikalisch-chemische Untersuchung des Antibiotikums	
14.3.1.	Dünnschichtchromatographie	25
14.3.2.	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	25

		Seite
14.3.3.	UV-Spektrum	25
14.3.4.	IR-Spektrum	26
III.	ERGEBNISSE	
A.	OPTIMIERUNG DER DESFERRI-FERRICROCIN-BILDUNG BEI ASPERGILLUS VIRIDI-NUTANS	
1.	Abhängigkeit der Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans von der Eisenkonzentration im Nährmedium	27
2.	Untersuchung zur optimalen Nährmedium-zusammensetzung bei Aspergillus viridi-nutans	
2.1.	Abhängigkeit der Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans von der Kohlenstoffquelle	29
2.2.	Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans auf verschiedenen Stickstoffquellen	31
3.	Untersuchung der optimalen Temperatur und Belüftung zur Sideraminbiosynthese bei Aspergillus viridi-nutans	
3.1.	Sideraminbildung bei verschiedenen Temperaturen im 20 l-Fermenter	35
3.2.	Sideraminbiosynthese bei unterschiedlichen Belüftungsbedingungen	35
4.	Sideraminproduktion bei Aspergillus viridi-nutans im Feed-Batch-Verfahren	
4.1.	Feeding von Nährstoffen über die pH-Regelung	
4.1.1.	Glucose als Kohlenhydrat	37
4.1.2.	Stärke als Kohlenhydrat	40
4.2.	Feeding von Nährstoffen abhängig vom Sauerstoffpartialdruck in der Submerskultur	40

Seite

B. UNTERSUCHUNG ZUR REGULATION DER SIDERAMINBIOSYNTHESE DURCH EISEN(III) BEI ASPERGILLUS VIRIDI-NUTANS

1. Sideraminbiosynthese bei verschiedenen Eisen(III)-Konzentrationen im Nährmedium 44

2. Untersuchung des zeitlichen Hemmverlaufes der Sideraminbiosynthese bei Aspergillus viridi-nutans nach Fe(III)-Sideramingaben 45

3. Wachstum und Atmung bei Aspergillus viridi-nutans bei unterschiedlichem Eisenangebot im Nährmedium

3.1. Wachstum und Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans im 20 l-Fermenter bei"Eisenmangel"und Eisenangebot 47

3.2. Atmungsaktivität von Aspergillus viridi-nutans bei verschiedenen Eisen(III)-Konzentrationen im Nährmedium 49

4. Ist die Hemmung der Sideraminbiosynthese durch Eisen(III) irreversibel? 50

5. Untersuchung des Zellhomogenats von Aspergillus viridi-nutans auf ^{55}Fe-Verbindungen nach ^{55}Fe(III)-Ferricrocingaben 53

6. Hemmung der Sideraminbiosynthese durch metallanaloge Sideraminverbindungen

6.1. Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans bei Zugabe von Fe(III), Al(III), Ga(III) bzw. V(III) zum Nährmedium 55

6.2. Sideraminbildung bei Zusatz metallanaloger Sideramine zu herangewachsenen Aspergillus viridi-nutans-Kulturen 57

6.3. Vergleichende Studien zur Sideraminproduktion bei Aspergillus viridi-nutans in Gegenwart von Fe(III) und Al(III)

		Seite
6.3.1.	Hemmung der Sideraminbiosynthese durch Al(III) bzw. Fe(III)	58
6.3.2.	Untersuchung des intrazellulären Sideramingehaltes bei Angebot von Fe(III) bzw. Al(III)	58
6.3.3.	Regulation des Sideraminaufnahmesystems	60
7.	Sideraminproduktion bei Aspergillus viridi-nutans in vitro	63
8.	NADH:Ferricrocin-Oxidoreduktase	67
C.	UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE DES δ-N-HYDROXY-L-ORNITHINS	
1.	Sideraminbiosynthese bei Aspergillus viridi-nutans in Gegenwart von Hydroxylamin	
1.1.	Zugabe von Hydroxylamin zu verschiedenen Nährmedien	70
1.2.	Hydroxylaminverfütterung an herangewachsene Aspergillus viridi-nutans-Kulturen	71
2.	Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans auf Ornithin als Stickstoffquelle	
2.1.	Sideraminbildung auf Ornithin im Schüttelkolben	72
2.2.	Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans auf Ornithin im 20 l-Fermenter	73
3.	Regulation der Ornithin-Biosynthese bei Aspergillus viridi-nutans	
3.1.	Sideraminbiosynthese bei Aspergillus viridi-nutans in Gegenwart von Arginin	75
3.2.	Einbau von ^{14}C-Glutaminsäure in Desferri-Ferricrocin in Gegenwart von Arginin in vivo	76

		Seite
D.	ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES ANTIBIOTIKUMS AUS DEM KULTURFILTRAT VON ASPERGILLUS VIRIDI-NUTANS	79
IV.	DISKUSSION	
A.	OPTIMIERUNG DER DESFERRI-FERRICROCIN-PRODUKTION BEI ASPERGILLUS VIRIDI-NUTANS	83
B.	REGULATION DER SIDERAMINBIOSYNTHESE DURCH EISEN	88
C.	BIOSYNTHESE VON δ-N-HYDROXY-L-ORNITHIN	95
D.	TOXISCHE SEKUNDÄRMETABOLITE BEI ASPERGILLEN	99
E.	"OPTIMALER" PRODUKTIONSSTAMM	101
V.	ZUSAMMENFASSUNG	102
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	104

I. EINLEITUNG

Sideramine sind mikrobielle Eisentransportverbindungen. Die eisenfreien Grundkörper werden von den Mikroorganismen unter Eisenmangelbedingungen in relativ großen Mengen ins Kulturmedium ausgeschieden (zusammenfassende Literatur siehe DIEKMANN, 1973; KELLER-SCHIERLEIN et al., 1964; NEILANDS, 1973; RODGERS und NEILANDS, 1973; ZÄHNER et al., 1962, 1963).

Zur Zeit besteht reges Interesse an Eisentransportverbindungen sowohl von der molekularbiologischen Seite (ARCENEAUX und BYERS, 1976; BRAUN et al., 1976; FROST und ROSENBERG, 1975; HANCOCK et al., 1976, 1977; HANCOCK und BRAUN, 1976; HANTKE und BRAUN, 1975 a, b; LEONG und NEILANDS, 1976; PUGSLEY und REEVES, 1977 a, b) als auch von der Anwendungsseite (WEINBERG, 1974; BULLEN et al., 1974).
Bei der Anwendung steht die Behandlung von Eisenspeicherkrankheiten mit Desferri-Sideraminen im Vordergrund, doch bestehen auch Überlegungen, Sideramine als Eisenspender einzusetzen. Sowohl bei Mikroorganismen als auch bei höheren Zellen bestehen beachtliche Unterschiede in bezug auf Aufnahmegeschwindigkeit der Sideramine und Eignung als Eisenspender (s. z.B. WINKELMANN, 1974; BARNEKOW und WINKELMANN, 1976). Nach Versuchen von BARNEKOW et al. (1974) stellt Ferricrocin für die höhere Zelle eine gut geeignete Eisentransportverbindung dar.
Auch in der Antibiotikaforschung könnten Sideramine eine Bedeutung erlangen, indem man sich den ausgezeichneten Transport der Sideramine in die Zelle durch kovalente Knüpfung von Antibiotika an das Sideramingerüst zunutze macht. Es könnte somit ein neues Feld von therapeutisch anwendbaren Antibiotika, die normalerweise nicht in die Zelle transportiert werden, erschlossen werden. Bei Antibiotika, gegen die Mikroorganismen relativ schnell eine Eindringungsresistenz entwickeln, könnten die Resistenzraten beim Einschleusen der Substanz über verschiedenartige Transportsysteme stark gesenkt werden.

Erste Versuche mit semisynthetischen Sideromycinen wurden bereits erfolgreich durchgeführt, z.B. mit dem 6-Sulfanilamid-Nicotinsäure-Ferricrocinylester, der eine antibiotische Aktivität gegen Staphylococcus aureus zeigt, die kompetitiv durch Ferricrocin aufgehoben werden kann (Zähner et al., 1977).

Im Hinblick auf die verschiedenartigen potentiellen Anwendungsbereiche für Sideramine erschien eine genaue Studie der Sideraminproduktion gerechtfertigt. Zur näheren Untersuchung wurde die Desferri-Ferricrocinproduktion ausgewählt, da Ferricrocin chemisch sehr stabil ist, von Mikroorganismen und höheren Zellen gut transportiert wird und sich gut zur Bildung semisynthetischer Sideromycine eignet.

Ferricrocin gehört zu den Sideraminen vom Ferrichromtyp (RODGERS und NEILANDS, 1973), die von Pilzen gebildet werden. Bei den Sideraminen der Ferrichromreihe ist ein Tripeptid aus 3 Monohydroxamsäuren mit einem weiteren Tripeptid, das Glycin, bei einigen Sideraminen zum Teil auch Serin enthält, zu einem Ring verknüpft. Während die N-Hydroxy-Komponente der Monohydroxamsäure stets δ-N-Hydroxy-L-ornithin ($HONH-(CH_2)_3-CHNH_2-COOH$) ist, kann die Säurekomponente, die mit der N-Hydroxygruppe die Hydroxamsäure bildet, Essigsäure (CH_3-COOH), cis- oder trans-5-Hydroxy-3-methyl-penten-2-säure ($HOCH_2-CH_2-C(CH_3)=CH-COOH$) oder trans-β-Methyl-glutaconsäure ($HOOC-CH_2-C(CH_3)=CH-COOH$) sein (EMERY, 1971 b). Die 3 Hydroxamsäuregruppen bilden mit Eisen(III) einen oktaedrischen Trihydroxamatkomplex. Ferricrocin, das Hauptsideramin bei Aspergillus viridinutans (DIEKMANN und KREZDORN, 1975), enthält 3 Moleküle δ-N-Acetyl-δ-N-hydroxy-L-ornithin sowie 2 Moleküle Glycin und 1 Molekül Serin.

Die Biosynthese der Sideramine wurde erst an wenigen Beispielen untersucht, z.B. Fusigensynthetase (ANKE et al., 1973), Pulcherriminsäurebiosynthese (PLATTNER und DIEKMANN, 1973; UFFEN und CANALE-PAROLA, 1972), Rhodotorula-

säuresynthetase (ANKE und DIEKMANN, 1972), Einbau von δ-N-Hydroxy-L-ornithin in Sideramine vom Ferrichromtyp (ANKE und DIEKMANN, 1974).
MÜLLER und DIEKMANN (1977) gelang bei Aspergillus fumigatus und Aspergillus quadricinctus eine Hexapeptidsynthese zu Ferricrocin bzw. Ferrichrom in vitro. Mechanistische Ähnlichkeiten der Hexapeptidsynthese bei Pilzen mit der Biosynthese von Peptidantibiotika bei Bakterien (PERLMAN und BODANSKY, 1971; KURAHASHI, 1974) sind noch nicht untersucht.

Unklar ist die Biosynthese der δ-N-Hydroxy-Aminogruppe von Ornithin. Beim Hadacidin - N-Hydroxy-N-formyl-glycin - konnte eine direkte Hydroxylierung der Aminogruppe durch molekularen Sauerstoff nachgewiesen werden (STEVENS und EMERY, 1966); bei der Biosynthese der Rhodotorulasäure erfolgt die Hydroxylierung des Stickstoffs ebenfalls in einer Oxygenasereaktion durch molekularen Sauerstoff (AKERS et al., 1972).

Über die Regulation von Enzymen der Sideraminbiosynthese durch Eisen ist noch sehr wenig bekannt. Bei Eisenmangel werden z.B. bei Aspergillus melleus verschiedene Säuren des Citronensäurecyclus wie Citronensäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure und vor allem α-Ketoglutarsäure in wesentlich größerer Menge ausgeschieden als bei ausreichender Eisenversorgung des Organismus (EBERLE-HAEGI, 1966). CRUEGER (1968) fand bei Aspergillus melleus eine erniedrigte Decarboxylasenaktivität (Pyruvatdecarboxylase, α-Ketoglutaratdecarboxylase) bei Eisenmangel. Eine Aktivität von näher untersuchten Enzymen der Sideraminbiosynthese, z.B. der Rhodotorulasäuresynthetase (ANKE und DIEKMANN, 1972; ANKE, 1973) oder der Fusigensynthetase (ANKE et al., 1973), ist bei Eisenangebot nicht nachweisbar.
Eisen reprimiert bei Aerobacter aerogenes und Escherichia coli die Enzyme, die Chorismat in 2,3-Dihydroxy-benzoat - eine Vorstufe für Enterochelin - überführen (YOUNG und GIBSON, 1969). Bei Escherichia coli reprimiert Eisen weiterhin die 2,3-Dihydroxybenzoylserinsynthetase (BROT und GOODWIN,

1968), die Enterochelinsynthetase (O'BRIEN et al., 1971) sowie die Enterochelin-Esterase (O'BRIEN et al., 1971).

Desferri-Ferricrocin wird von Aspergillus viridi-nutans gebildet. Aspergillen können auf verschiedene Weise humanpathogen wirken (EDWARDS und AL-ZUBAIDY, 1977):

a) Aspergillen als infektiöses Agens
b) saprophytisches Aspergillenwachstum
c) Hypersensitivitätsreaktionen - durch Aspergillen hervorgerufen
d) Aspergillus-Mycotoxine

Viele primäre und sekundäre Mycotoxicosen werden durch Aspergillus-Mycotoxine (MOOS, 1977) hervorgerufen. Bei der Optimierung von Fermentationsprozessen bei Aspergillen muß deshalb stets eine eventuelle Mycotoxinproduktion beachtet werden.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Optimierung der Desferri-Ferricrocinproduktion bei Aspergillus viridi-nutans.
Die Regulation der Sideraminbiosynthese durch Eisen sowie die Biosynthese von δ-N-Hydroxy-L-ornithin sollten näher erforscht werden, um durch vertiefte Stoffwechselkenntnisse Anhaltspunkte für erstrebenswerte Produktionsmutanten zu gewinnen.
Daneben sollte das Kulturfiltrat von Aspergillus viridi-nutans auf antibiotische Aktivitäten, die unter den Desferri-Ferricrocinproduktionsbedingungen anfallen, untersucht werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Soweit nicht besonders aufgeführt, handelt es sich um analysenreine Chemikalien der Firma Merck AG, Darmstadt.

Deutsche Ajinomoto GmbH Hamburg	: L-Asparagin-Monohydrat
Bio-Rad Laboratories GmbH München	: Bio-Gel P-2, 200-400 mesh
Boehringer, Mannheim	: Glucose-Oxydase (Schimmelpilz) Reinheitsgrad III Peroxydase (Meerrettich) Reinheitsgrad II Acetat-Kinase (E. coli) ABTS^{R} = 2.2-Azino-di-[3-äthyl-benzthiazolinsulfonat (6)] Adenosin-5-triphosphat (ATP) Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH) β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid reduzierte Form (βNADH)
Difco Laboratories, Detroit, Michigan (USA)	: Corn Meal Agar Bacto-Agar
Fluka AG, Buchs (Schweiz)	: Hydroxylamin-hydrochlorid puriss. p.a. Tween 80
(NEN) New England Nuclear Boston, Mass. (USA)	: Aquasol Universal LSC Cocktail
Oxoid Deutschland, Wesel	: Malt Extract Yeast Extract
Pharmacia Fine Chemicals Uppsala (Schweden)	: Sephadex G-75
Radiochemical Centre Amersham (U.K.)	: $^{55}FeCl_3$ in 0,1 N HCl, carrier free (0,5 mCi/2,2 µg Fe) [1-14 C]-Glycin (57 mCi/mMol, 740 µCi/mg)

	DL-[1-14 C]-Ornithinmonohydrochlorid (59 mCi/mMol, 345 µCi/mg)
	L-[U-14 C]-Glutaminsäure (10 mCi/mMol, 68 µCi/mg)
Roth OHG, Karlsruhe	: Glucosemonohydrat
Serva Feinbiochemica Heidelberg	: Amberlite Adsorberharz Typ XAD-2, 300-1000 µ
	Cellogelstreifen
	Alcoa A 305

2. Mikroorganismen

Abkürzungen der Kultursammlungen:

ATTC American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA
CBS Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande
Tü Institut für Biologie der Universität Tübingen, Lehrbereich Mikrobiologie

Aspergillus viridi-nutans Ducker & Thrower, CBS 127.56
Fusarium cubense Smith, Tü 133

Bacillus subtilis Cohn, ATTC 6051
Escherichia coli (Migula) Castellani et Chalmers K-12 - W 945
Saprolegnia asterophora de Bary - CBS 18044 +
Nematospora coryli Peglion, ATTC 10 647

3. Nährmedien

1) Hefeextraktmedium
(HA-Medium)
4 g Hefeextrakt
10 g Malzextrakt
4 g Glucose
1 l entionisiertes Wasser
20 g Agar zur Verfestigung
Der pH-Wert wurde vor dem Sterilisieren mit Natronlauge auf 7,2 eingestellt.

2) Normalmedium zur Sideraminfermentation
(in Anlehnung an EBERLE-HAEGI, 1966)
8 g C Hauptkohlenstoffquelle
1 g N Stickstoffquelle
1,31 g $K_2HPO_4 \cdot 3\ H_2O$
0,5 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$
1,0 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
2 mg $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$
1 l entionisiertes Wasser
Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

Varianten des Normalmediums:

a) Zusatz von Na-Acetat
b) anstatt 1,31 g $K_2HPO_4 \cdot 3\ H_2O$/l entionisiertes Wasser
1 l 1/15 M Phosphatpuffer (Na_2HPO_4/KH_2PO_4) pH 6,4
c) Zugabe von Hefeextrakt

Die Glucose wurde stets getrennt sterilisiert.
Es wurden analysenreine Substanzen mit möglichst geringem Eisengehalt verwendet.

3) Raulin-Thom-Lösung (RAISTRICK und RUDMAN, 1956)

75 g Glucose
4 g L (+) Weinsäure
4 g Diammoniumtartrat
600 mg $(NH_4)_2HPO_4$
250 mg $(NH_4)_2SO_4$
600 mg K_2CO_3
400 mg Magnesiumhydroxidcarbonat
70 mg $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$
70 mg $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$
1,5 l entionisiertes Wasser
Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

4) Synthetisches Medium für Testplatten mit Bacillus subtilis bzw. E. coli K-12
(Medium "130" des Institutes)

8 g Glucose
4 g Diammoniumtartrat
5 g NaCl
2 g $K_2HPO_4 \cdot 3\ H_2O$
1 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
0,2 g $CaCl_2 \cdot H_2O$
10 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$
20 mg Ferrioxamin
15 g Agar zur Verfestigung
1 l entionisiertes Wasser

5) Corn Meal Agar für Testplatten mit Saprolegnia asterophora
(CA-Medium)

17 g Difco Corn Meal Agar
1 l entionisiertes Wasser

4. Kulturbedingungen

4.1. Sporenkulturen

Sporen von Aspergillus viridi-nutans wurden durch Kultivieren des Pilzes auf Hefeextraktmedium bei 27°C erhalten.

4.2. Schüttelkolbenversuche

Die Versuche mit Aspergillus viridi-nutans wurden in 500 ml-Kolben mit 4 seitlichen Schikanen und einem langen bauchig ausgezogenen Hals (Spezialanfertigung der Fa. E. Bühler, Tübingen) - 100 ml Nährmedium pro Kolben - bei 27°C auf einer rotierenden Schüttelmaschine (Typ RC 106, Infors AG, Basel/Schweiz) bei 120 rpm und einem Auslenkradius von 25 mm durchgeführt.
Als Inoculum diente pro Kolben 1 ml Sporensuspension in Saline ($1 \cdot 10^8$ Sporen/ml Saline).

4.3. Fermentation

4.3.1. 10 l-Fermenter

Eine Fermentation im 10 l-Maßstab (10 l-Fermenter Modell FS-314, New Brunswick, New Jersey, USA) wurde zur Antibiotikumproduktion bei Aspergillus viridi-nutans durchgeführt.

Fermentationsbedingungen

arbeitendes Volumen	10 l
Temperatur	27°C
Belüftung	0,4 vvm
Blattrührerdrehzahl	200 rpm
Inoculum	10 % einer 4 Tage alten Schüttelkolbenkultur

4.3.2. 20 l-Fermenter

Zur Untersuchung der Sideraminproduktion bei Aspergillus viridi-nutans wurden 20 l-Fermenter mit Umwurfsystem verwendet.

Typ A: b 20, AG für biologische Verfahrenstechnik, Fabrikation und Verkauf in Lizenz durch Giovanola Frères S.A., Monthey, Schweiz.

Typ B: b 20, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, BR Deutschland.

Fermentationsbedingungen

arbeitendes Volumen	:	20 l
Temperatur	:	27°C
Belüftung	:	0,5 vvm
Propellerdrehzahl	:	1200 rpm
pH-Stat	:	6,5 ± 0,05 bzw. 6,4 ± 0,05
pH-Regelung	:	Phosphorsäure bzw. Natronlauge
Inoculum	:	60 ml Sporensuspension in Saline ($1 \cdot 10^8$ Sporen/ml Saline) bzw. Submerskultur

5. Untersuchung der Fermentationsproben

5.1. Mycelgewichtsbestimmung

Die Bestimmung des Myceltrockengewichts erfolgte nach EBERLE-HAEGI (1966).

5.2. Sideraminbestimmung und Aufarbeitung

5.2.1. Quantitative Sideraminbestimmung

Die Gesamtmenge der Sideramine wurde colorimetrisch nach Zugabe von Fe(III) zum Kulturfiltrat bei 436 nm bestimmt.

Testansatz A: 1 ml Kulturfiltrat; 1,5 ml Glycin/HCl-Puffer (0,2 M, pH 2,2); 0,5 ml Eisen(III)chlorid-Lösung (150 mg $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ + 1 ml HCl konz./ 100 ml Wasser).

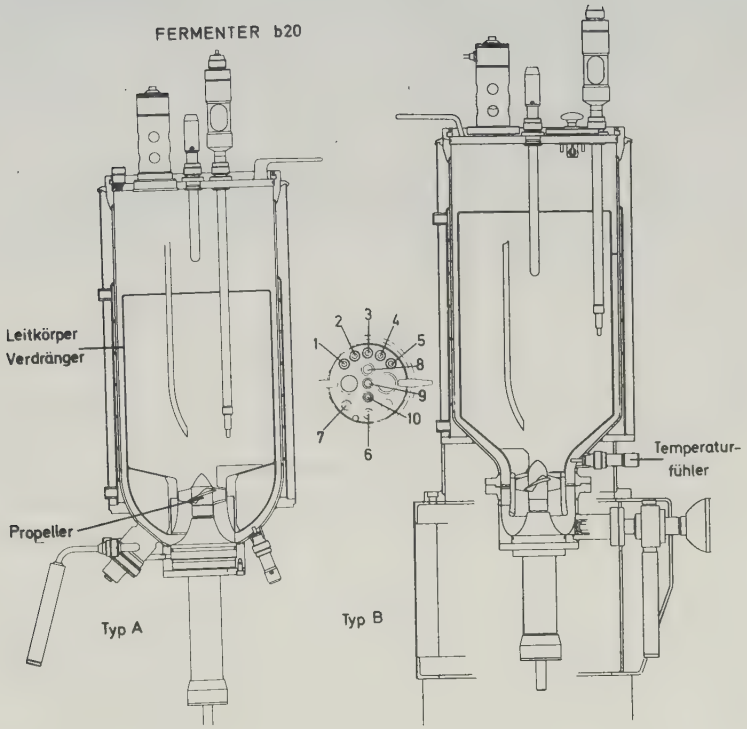
Leerwert A : 1 ml Kulturfiltrat; 1,5 ml Glycin/HCl-Puffer (0,2 M, pH 2,2); 0,5 ml Wasser

Modifizierte Sideraminbestimmung

Testansatz B: 2 ml Kulturfiltrat; 1 ml Glycin/HCl-Puffer (0,2 M, pH 2,2) mit Eisen(III)chlorid (300 mg $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$/200 ml Glycin/HCl-Puffer)

Leerwert B : 2 ml Kulturfiltrat; 1 ml Glycin/HCl-Puffer (0,2 M, pH 2,2).

Abb. 1: 20 l-Fermenter



1 Abluftkühler
2 Thermometer
3 pH-Elektrode
4 Säurezugabe
5 Laugezugabe
6 Inoculumzugabe
7 Antischaumzugabe
8 Sauerstoffelektrode (Typ A)
9 Antischaumsonde
10 Belüftungsrohr

Bei E_{436} > 1 wurde das Kulturfiltrat entsprechend verdünnt. Das Kulturfiltrat färbte sich bei längerer Fermentation gelb; es wurde deshalb stets gegen das Kulturfiltrat, anstatt gegen einen Leerwert mit Eisen(III)chlorid-Lösung gemessen.
Der Sideramingehalt des Kulturfiltrates (g/l) wurde durch Division der Extinktionswerte (bei 436 nm) im obigen Testansatz A durch 1,18 erhalten.

5.2.2. Qualitative Sideraminbestimmung

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Sideramine erfolgte nach DIEKMANN und KREZDORN (1975) auf Kieselgel 60-Fertigplatten (Merck) im Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser (65/25/4).

5.2.3. Sideraminaufbereitung

Fe(III)-Ferricrocin (modifiziert nach FIEDLER und SAUERBIER, 1978):
Die Isolierung des Fe(III)-Sideraminkomplexes aus dem Kulturfiltrat erfolgte durch Adsorption an Amberlite XAD-2 (300-1000 µ). Der Eisenkomplex kann durch ein Wasser/Aceton-Gemisch 18:x - wobei $x \geqslant 2$ - wieder desorbiert werden. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte an Bio-Gel P-2 (200 bis 400 mesh).
Desferri-Ferricrocin: Die Isolierung des eisenfreien Sideramins aus dem Kulturfiltrat erfolgte durch Adsorption an Amberlite XAD-4 (300-1000 µ). Elution und weitere Reinigung des Rohproduktes entsprachen der Aufarbeitung des Fe(III)-Sideraminkomplexes.

5.3. Glucosebestimmung

Die Glucose im Kulturfiltrat wurde enzymatisch nach BERGMEYER und BERNT (1974) mit Glucoseoxydase, Peroxydase und ATBS^{R} (≙ 2,2'-Azino-di-[3-äthylbenzthiazolinsulfonat(6)]; Boehringer, Mannheim) bestimmt.

5.4. Acetatbestimmung

Acetat im Kulturfiltrat wurde mit Acetatkinase und Hydroxylamin nach HOLZ und BERGMEYER (1974) in variierter Form bestimmt.

a) Die Inkubationszeit wurde verdoppelt.
b) Es wurden nur 2 ml einer doppelt konzentrierten Eisen(III)-chlorid-Lösung in den Test eingesetzt.

Bei der Acetatbestimmung wurden die gemessenen Extinktionswerte - bei 546 nm - durch die betreffenden Sideraminabsorptionswerte korrigiert.

5.5. Gesamtstickstoffbestimmung nach der Micro-Kjeldahl-Methode

5.6. Bestimmung der Ammoniumionen

Die Bestimmung der Ammoniumionen erfolgte nach Überführung in Ammoniak mit einer selektiven gassensitiven Elektrode (Orion Ammoniak-Elektrode, Modell 95-10, angeschlossen an ein Orion-Digital-pH/mV-Meter, Modell 701-00).

6. Meß- und Regelvorgänge am 20 l-Fermenter während der Fermentation

6.1. pH-Messung

Es wurde eine sterilisierbare pH-Elektrode (Typ 465-VT) der Fa. Ingold, Urdorf-Zürich (Schweiz) verwendet.

6.2. pO_2-Messung

Der Sauerstoffpartialdruck in der Submerskultur wurde mit einer sterilisierbaren Sauerstoffelektrode (Modell IL 531) der Fa. Ingold, Urdorf-Zürich (Schweiz) gemessen.

Beim Fermentertyp A - Sauerstoffelektrode senkrecht in der Submerskultur - wuchs öfters die Membran zu. Von HASENBÖHLER (1978) wurde eine Reinigungsvorrichtung für die Membran der Sauerstoffelektrode während der Fermentation entwickelt (Silicongummiwischer an einem Gestänge).
Beim Fermentertyp B - Sauerstoffelektrode horizontal in der Submerskultur - wird ein rasches Zuwachsen der Elektrodenmembran durch den parallel zur Membran fließenden Strom der Kulturflüssigkeit erschwert. Die Sauerstoffelektrode ist auf gleicher Höhe wie der Temperaturfühler (Abb. 1) horizontal in den Fermenterkessel eingeführt.

6.3. Bestimmung des Luftvolumens

Die Luftmenge, die während der Fermentation den Fermenter durchsetzte, wurde mit einem Laborgasmesser Typ L 5-PVC der Fa. Wohlgroth & Co., Zürich (Schweiz), bestimmt.

6.4. Sauerstoff- und Kohlendioxidmessung in der Fermenterabluft

6.4.1. Sauerstoffmessung

Die Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in der Abluft erfolgte im thermomagnetischen Sauerstoffanalysator MAGNOS 2 T (Hartmann & Braun AG, Frankfurt/Main). Bei diesem Meßverfahren nutzt man die paramagnetischen Eigenschaften des Sauerstoffs zur Konzentrationsbestimmung aus.

6.4.2. Kohlendioxidmessung

Der Kohlendioxidgehalt in der Abluft wurde durch IR-Messung im URAS 2 T (Hartmann & Braun AG, Frankfurt/Main) bestimmt.

7. Bestimmung der Atmungsaktivität bei Aspergillus viridi-nutans

Zur Bestimmung der Atmungsaktivität (Sauerstoffverbrauch/Zeiteinheit) wurde eine 3 ml Plexiglaskammer vollständig mit Kulturbrühe des Pilzes gefüllt, gut gerührt und die Sauerstoffelektrode in die Kammer eingeführt. Die Bestimmung des Sauerstoffpartialdruckes erfolgte mit einer Clark-Sauerstoffelektrode (Typ YSI 4004, Yellow Springs Instrument Co., Ohio (USA)). Zum Abeichen des 0 %-Sauerstoffwertes diente eine gesättigte Na_2SO_3-Lösung, zum Einstellen des 100 %-Sauerstoffwertes wurde Wasser verwendet, das wie die Kulturen in 500 ml 4 S-Kolben - 100 ml Flüssigkeit - während der Messungen auf einem LAB-Shaker (Modell Kühner, B. Braun, Melsungen) bei 120 rpm und 24°C geschüttelt wurde.

8. Untersuchung des Zellhomogenats von Aspergillus viridi-nutans nach $^{55}Fe(III)$-Ferricrocingaben

Inkubation des Mycels mit $^{55}Fe(III)$-Ferricrocin

Mycel von 5 Schüttelkolbenkulturen des Pilzes - Alter 4 Tage - auf einem variierten Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer) wurde abzentrifugiert und anschließend in einem 500 ml-4 S-Kolben mit 100 ml des obigen Nährmediums resuspendiert. Das Glutaminsäure/Glycin-Medium war $2 \cdot 10^{-4}$M an eisenfreiem Ferricrocin, $1 \cdot 10^{-4}$M an $FeCl_3$ und enthielt 66 µCi $^{55}Fe(III)$ (carrier free, 0,29 µg Fe(III)). Das angebotene Eisen wurde quantitativ von dem im Überschuß vorliegenden eisenfreien Sideramin gebunden. Die Kultur wurde 3 h bei 27°C in einem Infors-Schüttelwasserbad bei 120 rpm inkubiert. Anschließend wurde das Mycel geerntet und so lange mit eiskalter Saline gewaschen, bis im Waschwasser keine Radioaktivität mehr nachweisbar war.

Aufschluß des Mycels mit der X-press (MAGNUSSON und EDEBO, 1976)
Das gewaschene Mycel wurde in gleichem Volumen Phosphatpuffer (0,01 M, pH 7,0) aufgenommen und nach Einfrieren auf -20°C dreimal durch die 1,2 mm Düse der X-press gedrückt (300-400 kp/cm^2).

Untersuchung des Zellhomogenats
Nach dem Auftauen wurde das Homogenat bei verschiedenen g-Werten jeweils 1 h bei 4°C zentrifugiert:
a) 2 500 g b) 20 000 g c) 60 000 g.
Jeweils 2 ml der betreffenden Überstände wurden auf einer Sephadex G-75-Säule (Ø = 2 cm, Betthöhe = 88 cm) in Phosphatpuffer (0,01 M, pH 7,0, 0,02 % Na-Azid) bei 4°C chromatographiert. Die Laufgeschwindigkeit betrug 2,5 ml/10 min; das Eluat wurde jeweils in 30 Tropfen-Fraktionen (1,9 ml) aufgefangen.
Die niedermolekularen Sephadex G-75-Fraktionen des 60 000 g-Laufes wurden nach Lyophilisieren und Aufnahme in 1 ml Phosphatpuffer (0,01 M, pH 7,0, 0,02 % Na-Azid) auf einer Bio-Gel P-2-Säule (Ø = 2 cm, l = 60 cm) näher untersucht. Als Elutionsmittel diente Phosphatpuffer (0,01 M, pH 7,0, 0,02 % Na-Azid). Die Laufgeschwindigkeit betrug 2,5 ml/10 min; es wurden 1,9 ml-Fraktionen aufgefangen.

9. Herstellung des Al(III)-, Ga(III)- bzw. V(III)-Sideraminkomplexes

Eine 1 M wässrige Desferri-Ferricrocin-Lösung wurde mit der zweifachen molaren Menge an Al(III)sulfat, Ga(III)chlorid bzw. V(III)chlorid versetzt.
Die verschiedenen Metallkomplexe wurden durch Adsorptionschromatographie an Amberlite XAD-2 (300-1000 µ) isoliert. Die Aufarbeitung entsprach der Ferricrocinisolierung (II.5.2.3.).

10. Produktion von Fusigen/Fusarinin - Herstellung von δ-N-Hydroxy-L-ornithin und δ-N-Acetyl-δ-N-hydroxy-L-ornithin

10.1. Fusigen/Fusarinin-Herstellung

Die Fusigenproduktion mit Fusarium cubense erfolgte im 20 l-Fermenter (pH-statisch, pH 6,4; Säure: 3 N H_3PO_4, Lauge: 3 N NaOH) auf einem variierten Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure (0,5 g N/l), Ammoniumacetat (0,5 g N/l), Na-Acetat (4 g C/l)) unter Fermentationsbedingungen, wie sie für die Desferri-Ferricrocinproduktion angewandt wurden. Als Inoculum dienten 5 % einer 4 Tage alten Schüttelkolbenkultur auf einem variierten Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure (1 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer).

Nach 65 h zeigte die Kultur ein Maximum im Sideramingehalt (etwa 1 g Sideramin/l) und in der Mycelmasse (etwa 12 g Myceltrockensubstanz/l). Bei längerer Fermentation nahmen die Mycelmasse und der Sideramingehalt wieder ab; das Fusigen wurde fast vollständig zu Fusarinin gespalten.

Die Aufarbeitung des Fusigen/Fusariningemisches als Fe(III)-Komplex entsprach der Ferricrocinaufarbeitung (II.5.2.3.).

10.2. δ-N-Hydroxy-L-ornithin (nach ANKE, 1973)

5 g Fusigen/Fusariningemisch wurden in 25 ml Wasser gelöst, 8,75 g 8-Hydroxychinolin in 90 ml Methanol zugegeben und die Lösung 2 h bei 40°C geschüttelt. Anschließend wurde der schwarze Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand dreimal mit jeweils 200 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde mit konz. HCl bis zu einer Konzentration von 1,5 N versetzt und 40 min unter Stickstoff im siedenden Wasserbad am Rückflußkühler erhitzt. Nach schnellem Abkühlen wurde sofort mit jeweils 150 ml Chloroform zweimal ausgeschüttelt und die wässrige Phase im Exsiccator über NaOH getrocknet.

Das Roh-Hydroxyornithin wurde über Dowex-Ionenaustauscher-Harz (Typ 50 WX 4, 200-400 mesh) isoliert (ROGERS und NEILANDS, 1963). Eine Säule (Ø = 2,5 cm) wurde mit Ionenaustauscherharz bis zu einer Betthöhe von 26 cm beschickt; das Harz wurde mit 400 ml 1,5 N HCl und anschließend mit 300 ml entionisiertem Wasser gewaschen. Das Roh-Hydroxyornithin wurde in wenig Wasser auf die Säule aufgetragen. Zunächst wurde mit 200 ml Wasser nachgewaschen, anschließend mit 1,5 N HCl eluiert. Die TTC-positiven Fraktionen (TTC-Test siehe 11.3.) wurden am Rotationsverdampfer eingeengt und im Exsiccator über NaOH getrocknet. Es entstand ein gelbes harziges Öl. Das Öl wurde in wenig Wasser aufgenommen und der Gehalt an Hydroxyornithin via Aminosäurebestimmung mit Ninhydrin (Ornithin diente als Standard) gemessen.

Ausbeute: 710,4 mg δ-N-Hydroxy-L-ornithin

Bei der Elektrophorese in Ammoniumacetatpuffer (0,1 M, pH 5,0; 200 V, 30 min) auf Papier MN 214 (Machery & Nagel, Düren) konnte nach Besprühen des Chromatogramms mit Ninhydrin außer δ-N-Hydroxy-L-ornithin (Laufstrecke 1,3 cm zur Kathode) nur noch eine Spur 1-Hydroxy-3-amino-2-piperidon (Laufstrecke 1,7 cm zur Kathode) nachgewiesen werden.

10.3. δ-N-Acetyl-δ-N-hydroxy-L-ornithin (ANKE, 1973)

Etwa 80 mg δ-N-Hydroxy-L-ornithin (geringe Verunreinigung an 1-Hydroxy-3-amino-2-piperidon) wurden in 1,5 ml Wasser mit Pyridin auf einen pH-Wert von 4,3 gebracht. Die Lösung wurde auf 50°C erwärmt und Essigsäureanhydrid wurde in 10 µl-Portionen langsam zugegeben (insgesamt 70 µl in 20 min). Die abgekühlte Lösung wurde zunächst mit 15 ml Chloroform/Phenol (1/1, v/w) ausgeschüttelt, anschließend mit 8 ml Äther. Die wässrige Phase wurde im Exsiccator über Blaugel getrocknet.
Der ölige Rückstand wurde in 80 µl Wasser aufgenommen, auf Watman 3 MM-Chromatographiepapier aufgetragen und im Laufmittel n-Butanol-Äthanol-Wasser (4/1/1, Oberphase) aufstei-

gend chromatographiert.
Ein schmaler Streifen des Chromatogramms wurde zur Identifizierung mit Ninhydrin-Lösung besprüht. Das δ-N-Acetyl-δ-N-hydroxy-L-ornithin (Rf = 0,185) wurde mit Methanol eluiert.
Die Ausbeute an δ-N-Acetyl-δ-N-hydroxy-L-ornithin betrug 19,4 mg.

Bei der elektrophoretischen Reinheitsprüfung von δ-N-Acetyl-δ-N-hydroxy-L-ornithin auf Cellogelstreifen in Ammoniumacetatpuffer (0,1 M, pH 5,0; 200 V, 30 min) konnte nach Besprühen des Chromatogramms mit Ninhydrinlösung nur eine einheitliche Bande von δ-N-Acetyl-δ-N-hydroxy-L-ornithin am Start festgestellt werden.

11. Analytische Methoden

11.1. Proteinbestimmung

Proteinbestimmungsmethode des Institutes, modifiziert nach LOWRY et al., (1951)

Lösung A: 2 g K-Na-Tartrat, 100 g Na_2CO_3 in 500 ml 1 N NaOH mit entionisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt

Lösung B: 2 g K-Na-Tartrat, 1 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, 10 ml 1 N NaOH, 90 ml entionisiertes Wasser

Lösung C: 1 Vol.-Teil Folin-Ciocalteus Phenolreagenz und 15 Vol.-Teile entionisiertes Wasser

Als Eichprotein wurde Rinderserumalbumin verwendet.
Die proteinhaltigen Proben wurden im Wasserbad auf 50°C erwärmt. 0,9 ml Lösung A wurde dazugegeben und der Inkubationsansatz 10 min lang bei 50°C gehalten. Nach raschem Abkühlen auf 25°C wurde 0,1 ml Lösung B hinzugefügt und der Proteinbestimmungsansatz 10-15 min bei Raumtemperatur gehalten. Anschließend wurden 3 ml Lösung C unter kräftigem Schütteln dazugegeben und der Ansatz 10 min im 50°C-Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlen der Proben wurde die Extinktion bei 578 nm bestimmt.

11.2. Aminosäurebestimmung mit Ninhydrin (CLARK, 1964)

Quantitative Aminosäurebestimmung (ANKE, 1973)
0,5 ml der Testlösung (10^{-4}-10^{-3}M) wurden mit 1,5 ml Ninhydrinreagenz versetzt und die Reaktionsmischung 20 min im siedenden Wasserbad erwärmt. Anschließend wurde rasch abgekühlt, 8 ml 50 % n-Propanol zugegeben, die Lösung gut durchmischt und nach 10 min die Extinktion bei 578 nm gegen einen Leerwert mit 0,5 ml Wasser gemessen.

Ninhydrinreagenz: 200 mg $SnCl_2 \cdot 2\ H_2O$ wurden in 125 ml 0,2 M Citratpuffer pH 5,1 gelöst und zu einer Lösung von 5 g Ninhydrin in 125 ml Äthylenglykolmonomethyläther gegeben.

Das Reagenz wurde bei 4°C aufbewahrt.

Identifizierung von Aminosäuren (MERCK, 1970)
Zum Sichtbarmachen von Aminosäureflecken auf Chromatogrammen wurde eine 0,2 %ige Ninhydrinlösung in n-Butanol verwendet. Nach Besprühen wurde das Chromatogramm 5 min bei 100°C getrocknet.

11.3. Test auf δ-N-Hydroxy-L-ornithin mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) (modifiziert nach ANKE, 1973)

100 µl Testlösung wurden mit 200 µl einer Mischung aus 2 % TTC (in Wasser) und 1 N NaOH (1/1) versetzt. Bei Anwesenheit von δ-N-Hydroxy-L-ornithin oder eines anderen Reduktionsmittels ergab sich ein roter Niederschlag.

11.4. Radioaktivitätsmessung

Jeweils 0,5 ml von wässrigen Proben bzw. ausgekratzte Kieselgelbanden aus Dünnschichtchromatogrammen wurden mit 10 ml Scintillatorflüssigkeit (Aquasol Universal LSC Cocktail, New England Nuclear) versetzt. Die Radioaktivität der Proben wurde im Flüssigkeitsscintillationszähler (Mark II, Liquid Scintillation System, Nuclear Chicago) bestimmt. Da

die sideraminhaltigen Proben einen starken Farbquench zeigten, wurde eine Quenchkorrektur über den "Externen Standard" bestimmt.

12. Sideraminbiosynthese in vitro

Das Mycel von 4 Tage alten Aspergillus viridi-nutans-Kulturen auf einem Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Asparagin (1 g N/l)) wurde durch Abfiltrieren geerntet (etwa 800 mg Myceltrockensubstanz/l). Das Kulturfiltrat enthielt zu diesem Zeitpunkt etwa 150 mg Sideramin/l. Das Mycel wurde zunächst mit eiskaltem Wasser gewaschen, anschließend mit Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,2) und zuletzt mit eiskaltem Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,2, 1 mM DET) nachgewaschen.

A) Zellaufschluß mit Ultraschall

Das abzentrifugierte Mycel wurde in einem entsprechenden Volumen Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,2, 1 mM DET) aufgenommen und in einem Methanol-Eis-Bad auf 2°C abgekühlt. Die anschließende Ultraschallbehandlung erfolgte unter Eiskühlung 5·15 sec mit dem Branson-Sonifier B-12 (12"-Rüssel).

B) Zellaufschluß im Mörser

Das gewaschene feuchte Mycel wurde auf 2°C in einem Methanol-Eis-Bad abgekühlt, mit ALCOA versetzt und im Mörser zerrieben. Durch zwischenzeitliches Kühlen beim Zellaufschluß wurde die Temperatur stets unter 4°C gehalten.

Das Homogenat wurde 15 min bei 12 000 g (2°C) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war im Überstand kein Mycel mehr nachweisbar. Der Überstand wurde als Rohextrakt in den Inkubationsansatz eingesetzt.

Inkubationsansatz für den Einbautest (ANKE, 1973; MÜLLER, 1976)

1 000 µl	1 M Tris/HCl pH 7,2	1 000 µMol
200 µl	1 M $MgCl_2$	200 µMol
600 µl	0,25 M ATP (mit KOH neutralisiert)	150 µMol
50 µl	0,1 M Dithioerythrit	5 µMol
200 µl	[^{14}C]-Glycin 10 µCi	1/5 µMol
50 µl	0,1 M Serin	5 µMol

Beim Kontrolleinbautest mit ^{14}C-Ornithin:

200 µl $[^{14}C]$-Ornithin 10 µCi 1/5 µMol

Zum Inkubationsansatz wurden 6 ml Rohextrakt (etwa 20 mg Protein) gegeben und das in-vitro-System 25 min bei 37°C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml $FeCl_3$-Lösung (300 mg $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$/100 ml 0,2 M Glycin/HCl-Puffer pH 2,2) gestoppt. Kaltes Sideramin (200 µl 10^{-4} M Ferricrocinlösung) wurde nur zugesetzt bei Ansätzen mit Rohextrakt aus Mycel, dessen Sideraminbiosynthese durch Fe(III) unterdrückt war. Die Isolierung der Sideramine erfolgte analog der Ferricrocinaufarbeitung (II.5.2.3.). Die lyophilisierten Proben wurden in etwa 100-200 µl Wasser aufgenommen und auf DC-Alufolien Kieselgel 60 F_{254} (Schichtdicke 0,2 mm) im Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser (65/25/4) aufgetrennt. Jeweils 5 mm breite Zonen wurden aus dem Chromatogramm zur Radioaktivitätsbestimmung im LSC ausgekratzt.
Zum eindeutigen Beweis, daß die Radioaktivität in den Sideraminbanden lediglich von Ferricrocin bzw. Ferrichrom herrührt, wurden die Sideraminbanden nach der ersten Dünnschichtchromatographie im Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser (65/25/4) ausgekratzt, die Sideramine mit Wasser aus dem Kieselgel eluiert, das Eluat lyophilisiert und anschließend dünnschichtchromatographisch in den Laufmitteln Chloroform/Methanol/Wasser (65/25/4) bzw. n-Propanol/Eisessig/Wasser (4/1/1), deren Laufeigenschaften für Ferricrocin und Ferrichrom gerade umgekehrt sind, untersucht. Während die Ferricrocinbande stets an ihrer orangen Farbe zu erkennen war, da die Proben genügend kaltes Ferricrocin enthielten, wurde zur Identifizierung der Ferrichrombande etwas kaltes Ferrichrom den Proben zugesetzt.

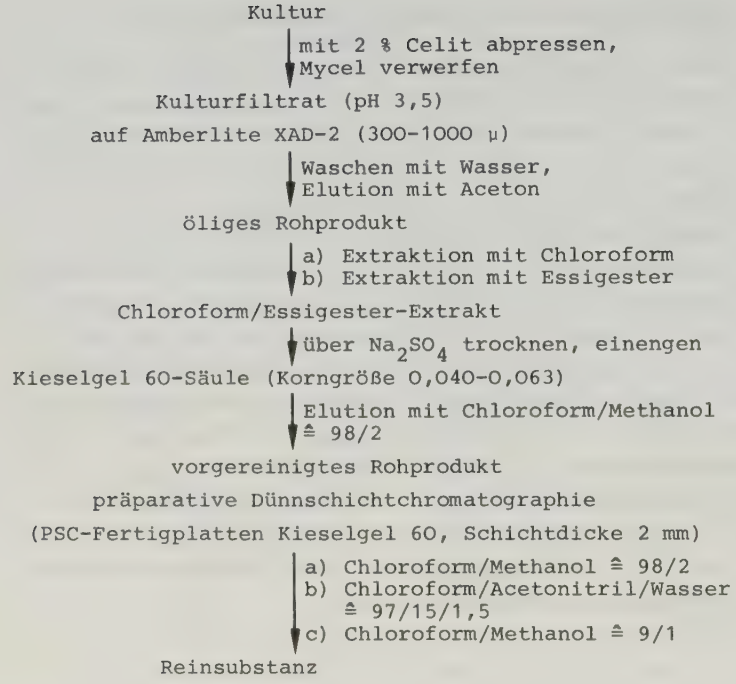
13. Bestimmung der NADH:Sideramin-Oxidoreduktase

Mycel von 4 Tage alten Aspergillus viridi-nutans-Kulturen auf einem Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Asparagin (1 g N/l)) wurde im Mörser bei 2°C aufgeschlossen (II.12) und bei 12 000 g 15 min bzw. bei 48 000 g 60 min bei 2°C zentrifugiert.
Nach BROWN und RATLEDGE (1975), ERNST und WINKELMANN (1977, b) wurden 0,5 ml des klaren Zentrifugationsüberstandes zusammen mit 200 nMol (200 µl) Ferricrocin, 10 µMol (100 µl) EDTA und 1,1 ml 0,1 M Tris/HCl-Puffer (pH 7,0) in eine 3 ml Anaerob-Küvette mit Bulbus (Hellma 193 F-QS-Küvette, Bachofer, Reutlingen) gegeben. In den Bulbus wurden 10 µMol (100 µl) NAD(P)H pipettiert, die Oberfläche des Küvetteninhaltes mit N_2 (99,995 % N_2) überblasen und die Küvette anschließend 10 min bei 27°C bzw. 37°C in einem Eppendorf-Photometer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe der NAD(P)H-Lösung gestartet. Die Extinktionsabnahme wurde bei 436 nm verfolgt.

14. Isolierung und Charakterisierung einer antibiotischen Aktivität bei Aspergillus viridi-nutans

14.1. Isolierung

Als Testorganismen im Plattendiffusionstest (nach ZÄHNER und MAAS, 1972) dienten Bacillus subtilis (Medium 130) und Saprolegnia asterophora (CA-Medium).



14.2. Biologische Charakterisierung des Antibiotikums

14.2.1. Plattendiffusionstest (ZÄHNER und MAAS, 1972)

Teststamm	Medium	Inkubationstemperatur
Escherichia coli K-12	130	37°C
Bacillus subtilis	130	37°C
Saprolegnia asterophora	CA	27°C
Nematospora coryli	HA	Raumtemperatur

14.2.2. Verdünnungsreihentest (ZÄHNER und MAAS, 1972)

Die minimale Hemmkonzentration des Antibiotikums im Verdünnungsreihentest wurde gegen Bacillus subtilis auf Medium 130 bestimmt. Die Röhrchen wurden mit Sporen zu E_{578} = 0,1 angeimpft; Inkubation der Röhrchen bei 37°C auf der rotierenden Schüttelmaschine.

14.3. Physikalisch-chemische Untersuchung des Antibiotikums

14.3.1. Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographische Charakterisierung der Substanz erfolgte auf DC-Alufolien Kieselgel 60 F_{254} in den Laufmitteln Chloroform/Methanol/Wasser (65/25/4) bzw. Chloroform/Acetonitril/Ameisensäure (97/15/1,5).

Nachweis der Substanz:
a) Fluoreszenzlöschung
b) Vanillin-Schwefelsäure (STAHL, 1967)
c) Bioautogramm (Saprolegnia asterophora bzw. Bacillus subtilis als Testorganismus)

14.3.2. Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Eine methanolische Lösung des Antibiotikums (1 mg/ml) wurde mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph Du Pont (Du Pont de Nemours, Bad Nauheim) auf Einheitlichkeit untersucht; als Trennsäule diente eine LiChrosorb RP-8 (10 µ)-Fertigsäule (3,2 x 250 mm) (Merck). Die mobile Phase bestand primär aus Wasser, sekundär aus Methanol; die lineare Gradientensteigung betrug 5 %/min - Fluß: 1 ml/min. Die Detektierung der Substanz erfolgte mit dem Spektralphotometer Du Pont 837 (Empfindlichkeit 1,28 EE) bei 240 nm.

14.3.3. UV-Spektrum

Zur Aufnahme des UV-Spektrums des Antibiotikums diente das Beckman Spectralphotometer DB-GT.

14.3.4. IR-Spektrum

Das IR-Spektrum der antibiotischen Substanz wurde im Perkin-Elmer 137 Sodium Chloride Spectrophotometer in KBr aufgenommen (1 mg Antibiotikum/300 mg KBr).

III. ERGEBNISSE

A. OPTIMIERUNG DER DESFERRI-FERRICROCIN-BILDUNG BEI ASPERGILLUS VIRIDI-NUTANS

1. Abhängigkeit der Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans von der Eisenkonzentration im Nährmedium

Aspergillus viridi-nutans zeigte im Schüttelkolben auf einem variierten Normalmedium die in Abbildung 2 dargestellte Abhängigkeit des Sideramingehaltes im Kulturfiltrat von der Eisenkonzentration des Nährmediums.

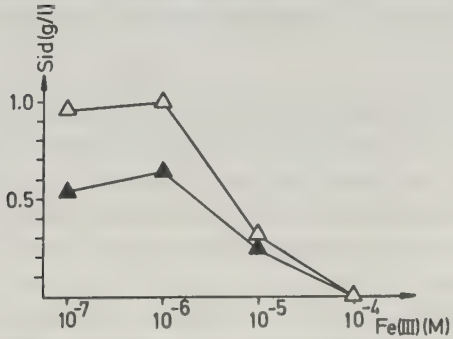


Abb. 2: Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration des Nährmediums.

Variiertes Normalmedium: 8 g C/l aus Glucose, 0,5 g N/l sowohl aus Glutaminsäure als auch aus Glycin, 1/15 M Phosphatpuffer pH 6,4. ▲—▲ Sideramingehalt im Kulturfiltrat am 8. Tag; △—△ Sideramingehalt im Kulturfiltrat am 12. Tag.

Zum Zubereiten der Nährmedien wurden stets analysenreine Substanzen mit möglichst geringem Eisengehalt sowie entionisiertes Wasser verwendet.

2. Untersuchung zur optimalen Nährmediumzusammensetzung bei Aspergillus viridi-nutans

EBERLE-HAEGI (1966) hatte bei der Untersuchung der optimalen Sideraminbildungsbedingungen bei Aspergillus melleus Yukawa gefunden, daß auf einem definierten Nährmedium mit Glucose als Hauptkohlenstoffquelle (8 g C/l) und Asparagin als Stickstoffquelle (1 g N/l) gute Sideraminausbeuten erzielt werden können.
Auf diesem Nährmedium konnten bei Aspergillus viridi-nutans im 20 l-Fermenter (ohne pH-Regelung) über einen Zeitraum von 60 h Sideraminbildungsgeschwindigkeiten von 10 mg/l·h erreicht werden. Desferri-Ferricrocin war mit über 95 % das Hauptsideramin.
Da bei der Optimierung der Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans - im Gegensatz zu den Arbeiten von CRUEGER und ZÄHNER (1968) bei Aspergillus melleus Yukawa - Desferri-Ferricrocin stets das Hauptsideramin darstellte, wurde nur der Gesamtsideramingehalt bestimmt, der vereinfacht dem Desferri-Ferricrocingehalt gleichgesetzt werden kann. Das eisenfreie Sideramin wird nicht in der Zelle angehäuft, sondern vom Produzenten sofort ins Kulturmedium ausgeschieden; deshalb wurde vereinfachend Sideraminausscheidungsgeschwindigkeit gleich Sideraminbildungsgeschwindigkeit gesetzt.
Um nähere Anhaltspunkte über den Weg der Optimierung des Sideraminfermentationsprozesses bei Aspergillus viridi-nutans zu erhalten, wurden zu Beginn der Optimierung alle Bestandteile des Asparagin-Nährmediums von EBERLE-HAEGI (1966) verdoppelt und Wachstum und Produktionsverhalten des Pilzes im 20 l-Fermenter näher untersucht. Es wurde bei einem konstanten pH-Wert von 6,5 fermentiert.
Das Fermentationsergebnis überraschte: auf dem doppelt konzentrierten Asparagin-Nährmedium zeigte der Pilz mehr als doppelte Wachstumsgeschwindigkeit, während die Sideraminbildungsgeschwindigkeit auf ein Drittel sank. Es zeigte sich somit bei diesem Organismus eine enge - aber negative - Verknüpfung von Wachstumsgeschwindigkeit und Sideraminbildungsgeschwindigkeit.

In den folgenden Versuchen wurde zunächst der Einfluß verschiedener Substanzen auf die Sideraminbildung von Aspergillus viridi-nutans näher untersucht.

2.1. Abhängigkeit der Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans von der Kohlenstoffquelle

Zur Biosynthese von Ornithin, das als δ-N-Acetyl-δ-N-hydroxy-L-ornithin in Sideramine vom Ferrichromtyp eingebaut wird (ANKE und DIEKMANN, 1974), ist ein aktiver Citronensäurecyclus notwendig, damit genügend α-Ketoglutarat zur Glutaminsäure- und somit zur Ornithinbiosynthese zur Verfügung steht.

Bei Zugabe von Säuren aus dem Citronensäurecyclus zum Asparagin-Nährmedium nach EBERLE-HAEGI (1966) in einer Konzentration von 5 g C/l konnten bei Aspergillus viridi-nutans in Schüttelkolben die Sideraminausbeuten in keinem Fall um mehr als 20 % gesteigert werden.

CRUEGER und ZÄHNER (1968) hatten bei Aspergillus melleus Yukawa gefunden, daß durch Zugabe von Acetat zum Nährmedium die Sideraminausbeuten signifikant gesteigert werden können. Aspergillus viridi-nutans zeigte im Schüttelkolben auf dem Normalmedium mit Glucose als Kohlenstoff- und Asparagin als Stickstoffquelle die in Tabelle 1 dargestellte Abhängigkeit der Sideraminausbeuten von der Acetatkonzentration im Nährmedium. Während im Schüttelkolben die Sideraminausbeuten um mehr als 100 % gesteigert werden konnten, lag im 20 l-Fermenter bei Zusatz von 20 g Na-Acetat (7,5 g C/l) zum Normalmedium zwar keine erhöhte Sideraminbildungsgeschwindigkeit des Pilzes im Vergleich zum Normalmedium vor, jedoch konnte der Zeitraum der maximalen Sideraminbildungsgeschwindigkeit von 10 mg/l·h um 10 h verlängert werden.

Tabelle 1: Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans in Abhängigkeit von der Acetatkonzentration im Normalmedium

Na-Acetat	8. Tag		12. Tag	
(g/l)	pH	Sid. (g/l)	pH	Sid. (g/l)
0	5,8	0,49	6,2	0,6
5	7,6	0,64	7,9	1,0
10	9,0	0,85	8,8	1,14
20	9,0	0,95	8,9	1,32
40	8,8	0,83	9,0	1,2

Schüttelkolbenversuch: Normalmedium: Glucose (8 g C/l), Asparagin (1 g N/l)

Beim Ersatz der Hauptkohlenstoffquelle Glucose im Normalmedium durch andere Kohlenstoffquellen zeigte der Pilz im Schüttelkolben eine deutliche Abhängigkeit der Sideraminausbeuten von der Hauptkohlenstoffquelle, wie in Tabelle 2 gezeigt wird.

Tabelle 2: Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans auf verschiedenen Hauptkohlenstoffquellen

Kohlenstoff-	8. Tag			12. Tag		
quelle	Wachstum	pH	Sid. (g/l)	Wachstum	pH	Sid. (g/l)
Glucose	++	5,8	0,49	+++	6,2	0,6
Fructose	++	6,7	0,36	+++	7,5	0,6
Mannose	+++	6,2	0,7	++++	7,6	1,13
Saccharose	+++	5,4	0,44	+++	7,0	0,85
Stärke	+	5,3	0,23	++	5,4	0,5
Glycerin	(+)	7,6	0,13	(+)	7,7	0,16

Schüttelkolbenversuch: Normalmedium: 8 g C/l aus Hauptkohlenstoffquelle, 1 g N/l aus Asparagin. Bewertung der Mycelmasse mit "+" bei mäßigem Wachstum bis "++++" bei sehr gutem Wachstum.

Bei sehr gutem Wachstum des Pilzes wurden in Schüttelkolben auch stets gute Sideraminausbeuten erhalten (Tabelle 2). Eine Verdopplung der Glucosekonzentration im Nährmedium führte unter Schüttelkolbenbedingungen fast zu einer Verdopplung der Sideraminausbeuten.

2.2. Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans auf verschiedenen Stickstoffquellen

Um das relativ teuere Asparagin durch billigere und eventuell - hinsichtlich der Sideraminbildung des Organismus - bessere Stickstoffquellen zu ersetzen, wurden Wachstum und Sideraminbildung des Pilzes auf verschiedenen Stickstoffquellen näher untersucht.
Bei Ersatz des Asparagin im Normalmedium durch andere N-Quellen in einer Gesamtkonzentration von 1 g N/l wurden in Schüttelkolben die in Tabelle 3 aufgezeigten Sideraminausbeuten erhalten.

Tabelle 3: Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans auf verschiedenen Stickstoffquellen

Stickstoffquelle (1 g N/l)	8. Tag Wachstum	pH	Sid. (g/l)	12. Tag Wachstum	pH	Sid. (g/l)
Asparagin	++	5,7	0,49	+++	5,7	0,7-0,8
Glutaminsäure	+++	8,1	0,4	+++	8,7	0,74
Glycin	++	5,8	0,36	+++	5,6	0,58
Serin	+++	5,3	0,38	+++	5,2	0,55
Glutaminsäure/ Glycin	+++	7,1	0,43	++	7,5	0,81
Glutaminsäure/ Glycin/Serin	+++	6,4	0,53	+++	6,3	0,83
Ammoniumacetat	+	6,9	0,08	+	6,9	0,17
Ammoniumacetat/ Glutaminsäure	++	6,4	0,58	+++	7,5	1,0
Harnstoff	+	7,0	0,28	++	6,8	0,4
Harnstoff/ Glutaminsäure	+++	7,8	0,67	+++	8,3	0,86

Schüttelkolbenversuch: Normalmedium: Glucose (8 g C/l); Ersatz des Asparagin durch andere N-Quellen in einer Gesamtkonzentration von 1 g N/l. Bewertung der Mycelmasse mit "+" bei mäßigem Wachstum bis "+++" bei gutem Wachstum.

Wie die Sideraminausbeuten auf dem Normalmedium mit verschiedenen Stickstoffquellen zeigen (Tabelle 3), kann das teuere Asparagin, das bislang für eine gute Sideraminbildung verwendet wurde, in Schüttelkolben gut durch billigere Stickstoffquellen wie Glutaminsäure bzw. äquimolare Stickstoffquellengemische - z.B. Ammoniumacetat/Glutaminsäure oder Harnstoff/Glutaminsäure - ersetzt werden.

In den folgenden Versuchen wurde die Sideraminbildung des Pilzes im 20 l-Fermenter Typ A auf Glutaminsäure, einem äquimolaren Glutaminsäure/Ammoniumacetatgemisch sowie Ammoniumacetat in einer Gesamtkonzentration von 1 g N/l untersucht. Als Nährmedium diente das variierte Normalmedium mit Glucose und Na-Acetat. Die Fermentation erfolgte pH-statisch (pH 6,5).
In Abb. 3 sind Wachstum - anhand des Myceltrockengewichts - Sideramingehalt sowie Kohlenstoff- und Stickstoffkonzentration im Kulturfiltrat der verschiedenen Fermentationen aufgezeigt. Eine Sporensuspension in Saline diente als Inoculum.
In Tabelle 4 werden die Sideraminbildungs- und Wachstumsgeschwindigkeiten der verschiedenen 20 l-Fermentationen auf dem variierten Normalmedium (7,5 g C/l aus Acetat) mit Glutaminsäure, Glutaminsäure/Ammoniumacetat bzw. Ammoniumacetat einer 20 l-Fermentation auf einem entsprechenden Medium mit Asparagin als N-Quelle gegenübergestellt.

Bei sehr schnellem Wachstum des Pilzes im 20 l-Fermenter, z.B. mit Glutaminsäure als N-Quelle (anfangs etwa 370 mg Myceltrockensubstanz/l·h), zeigte der Organismus relativ schlechte Sideraminbildungsgeschwindigkeiten. Eine "gute" Sideraminproduktion über einen längeren Zeitraum konnte dagegen bei langsamem Wachstum - z.B.auf Ammoniumacetat - erhalten werden.
Wie die Analysenkurven des Kohlenstoffgehalts aus Glucose bzw. Acetat und des Stickstoffs im Nährmedium in Abbildung 3 zeigen, werden die Nährstoffe rasch aufgebraucht. Nach Auf-

Tabelle 4: Sideraminbildungsgeschwindigkeit und Wachstumsgeschwindigkeit bei max. Sideraminproduktion bei Aspergillus viridi-nutans im 20 l-Fermenter

N-Quelle	Sideraminbildungsgeschwindigkeit (mg/l·h)	Wachstumsgeschwindigkeit; Zunahme des Myceltrockengewichts/Zeit (mg/l·h)
Asparagin	70 h: 9,6	75
Glutaminsäure	30 h: 11,5	160 (anfangs wesentlich schneller)
Glutaminsäure/ Ammoniumacetat	70 h: 12,7 (davon 50 h: 15)	160
Ammoniumacetat	100 h: 9,5 (später nur noch 5-8)	70

Variiertes Normalmedium: 8 g C/l aus Glucose; 7,5 g C/l aus Acetat; 1 g N/l aus N-Quelle.

brauchen der Nährstoffe knickt die "Sideraminkurve" zeitlich etwas verzögert nach der "Myceltrockengewichtskurve" ab.

Da infolge der negativen Korrelation zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Sideraminbildungsgeschwindigkeit im 20 l-Fermenter die Nährstoffkonzentration im Batchansatz nicht erhöht werden darf, um bessere Sideraminausbeuten zu erzielen, müssen der Kultur während der Fermentation dem Bedarf entsprechend C- und N-Quellen zugefüttert werden, um die Zeitspanne der maximalen Sideraminbildungsgeschwindigkeit zu verlängern.
Prinzipiell bieten sich zu einer dem Bedarf entsprechenden Zufütterung bei der diskontinuierlichen Fermentation zwei Möglichkeiten an:

a) Feeding von Kohlenstoff- und Stickstoffquellen über die pH-Regelung
b) Feeding von Nährlösung abhängig vom Sauerstoffpartialdruck in der Submerskultur.

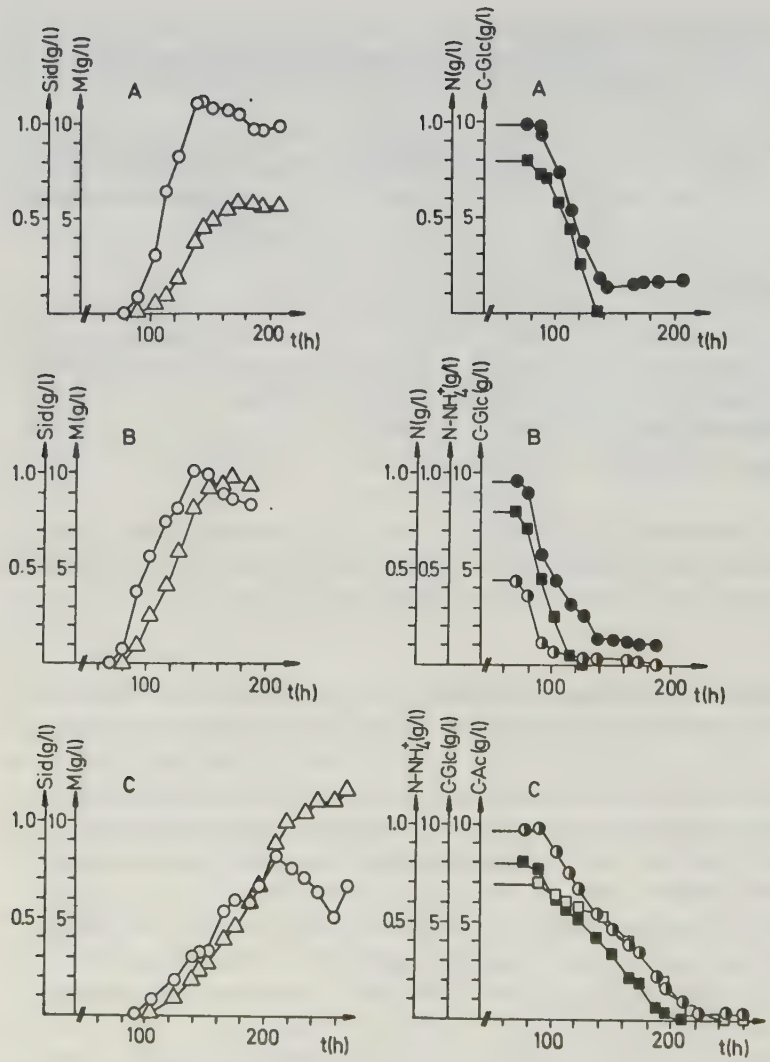


Abb. 3 A-C: Fermentation von Aspergillus viridi-nutans im 20 l-Fermenter auf verschiedenen N-Quellen

Variiertes Normalmedium: 8 g C/l aus Glucose, 7,5 g C/l aus Acetat; 1 g N/l, (A) Glutaminsäure, (B) Glutaminsäure/Ammoniumacetat, (C) Ammoniumacetat.

△—△ Sid. (g/l), ○—○ M (g/l), ●—● N (g/l), ◑—◑ $N\text{-}NH_4^+$ (g/l), ■—■ C-Glc (g/l), □—□ C-Ac (g/l)

3. Untersuchung der optimalen Temperatur und Belüftung zur Sideraminbiosynthese bei Aspergillus viridi-nutans

3.1. Sideraminbildung bei verschiedenen Temperaturen im 20 l-Fermenter

Temperatureffekte auf die Sideraminproduktion bei Aspergillus viridi-nutans wurden näher untersucht, um vertiefte Kenntnisse über das Wechselspiel zwischen Wachstumsgeschwindigkeit des Organismus und Sideraminbildungsgeschwindigkeit zu erlangen.
Wachstum und Sideraminbiosynthese des Pilzes wurden im 20 l-Fermenter (Typ A) auf dem Normalmedium (Glucose 8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l)) bei 24, 27, 30 und 33°C untersucht. Als Inoculum dienten 5 % einer 4 Tage alten Schüttelkolbenkultur auf dem entsprechenden variierten Normalmedium (1/15 M Phosphatpuffer). Zunächst wurde bei 27°C unter den normalen Sideraminfermentationsbedingungen fermentiert. Bei einem Myceltrockengewicht von 1-2 g/l wurde ein Temperaturshift auf die gewünschte Temperatur durchgeführt. Der Fermentationsverlauf ist in Abb. 4 dargestellt.

3.2. Sideraminbiosynthese bei unterschiedlichen Belüftungsbedingungen

Die Desferri-Ferricrocinbiosynthese bei Aspergillus viridi-nutans wurde bei verschiedenen Belüftungsbedingungen in Schüttelkolben (ohne Schikane, 1 bzw. 4 Schikanen) näher untersucht. Der Sideramingehalt während der Fermentation bei 27°C auf der rotierenden Inkubationsschüttelmaschine (120 rpm) ist in Abb. 5 dargestellt.
In 4 S-Kolben wuchs Aspergillus viridi-nutans mit watteartigem Mycel, in Normalkolben in Form kleiner Kügelchen (Pellets).

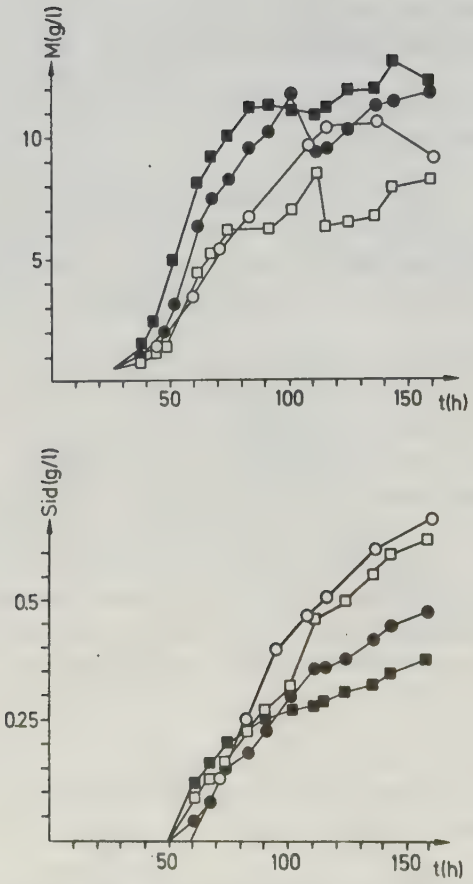


Abb. 4: Wachstum und Sideraminbildung des Pilzes im 20 l-Fermenter bei verschiedenen Temperaturen

●—● 24°C, ○—○ 27°C, ■—■ 30°C, □—□ 33°C

Normalmedium: Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/ Glycin (jeweils 0,5 g N/l)

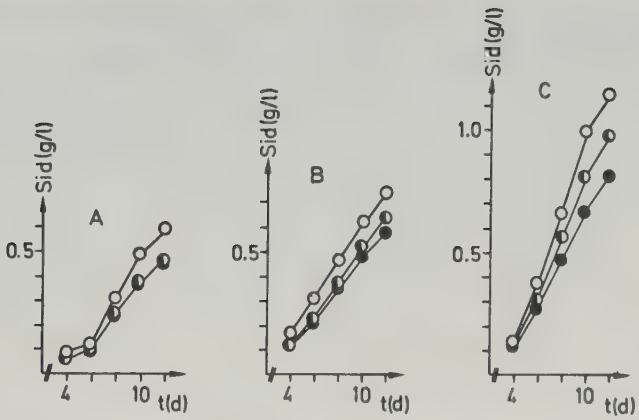


Abb. 5: Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans unter verschiedenen Belüftungsbedingungen

Schüttelkolbenversuch: var. Normalmedium: Glucose (8 g C/l) in 1/15 M Phosphatpuffer

A: Ammoniumacetat (1 g N/l)
B: Asparagin (1 g N/l)
C: Glutaminsäure/Glycin (0,5 g N/l / 0,5 g N/l)

○—○ 4 S-Kolben, ◐—◐ 1 S-Kolben, ●—● N-Kolben

4. Sideraminproduktion bei Aspergillus viridi-nutans im Feed-Batch-Verfahren

4.1. Feeding von Nährstoffen über die pH-Regelung

Die über die pH-Regelung ins Kulturmedium gegebenen organischen Säuren werden vom Organismus aufgenommen und metabolisiert. Die Säuren werden immer nur dem Bedarf entsprechend dem Nährmedium zugegeben.

4.1.1. Glucose als Kohlenhydrat

Als Ausgangsmedium zur Feed-Batch-Fermentation im 20 l-Fermenter diente das variierte Normalmedium mit 8 g C/l aus

Glucose, 7,5 g C/l aus Acetat sowie Ammoniumacetat bzw. Harnstoff zu $C_{Glucose + Acetat}/N_{Ammoniumacetat\ bzw.\ Harnstoff} \triangleq 8/1$. Als Feedinglösung erwies sich ein Gemisch mit 50 %iger Essigsäure und N-Quelle (Harnstoff bzw. Ammoniumacetat) zu einem C/N-Verhältnis von 8/1 als günstig zum Erreichen guter Sideraminbildungsgeschwindigkeiten. Die Versuche wurden im 20 l-Fermenter (Typ A) bei pH 6,5 durchgeführt. Die Fermenter wurden mit 5 % einer Submerskultur angeimpft; die N-Quelle der Impfkultur entsprach der Haupt-N-Quelle der 20 l-Fermentation. In Abb. 6 ist der Verlauf eines Feedingexperimentes mit Essigsäure/Harnstoff dargestellt.

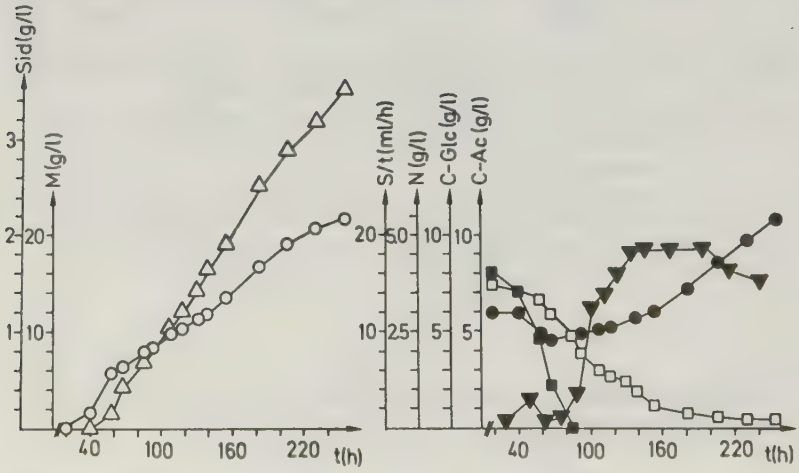


Abb. 6: Fermentationsverlauf bei Aspergillus viridi-nutans bei Feeding von Nährstoffen über eine pH-Regelung.

Variiertes Normalmedium/ Glucose (8 g C/l), Na-Acetat (7,5 g C/l), Harnstoff (1,93 g N/l) zusätzlich Glutaminsäure (0,5 g N/l), Glycin (0,5 g N/l). Feedinglösung: 50 %ige Essigsäure/Harnstoff (C/N = 8/1); pH-Stat: pH 6,5 ± 0,05.

△—△ Sid. (g/l), ○—○ M (g/l), ●—● N (g/l), ■—■ C-Glc (g/l), □—□ C-Ac (g/l), ▼—▼ S/t (ml/h).

In Tabelle 5 sind die erreichten Sideraminbildungsgeschwindigkeiten der beiden Feedingfermenter einander gegenübergestellt.

Tabelle 5: Sideraminbildungsgeschwindigkeit bei Aspergillus viridi-nutans bei Feeding von Nährstoffen über eine pH-Regelung (pH 6,5) im 20 l-Fermenter

Feeding-Fermenter A	
Nährmedium	Glucose - Na-Acetat - Ammoniumacetat 8 g C/l 1,93 g N/l 7,5 g C/l C/N = 8/1
Feedinglösung	50 %ige Essigsäure/Ammoniumacetat C/N = 8/1
Sideramin-bildungs-geschwindigkeit	240 h 13,8 mg Sid./l·h (davon 70 h 16,2 mg/l·h, anschließend 12,8 mg/l·h; bei Abbruch der Fermentation 12,4 mg/l·h)
Feeding-Fermenter B	
Nährmedium	Glucose - Na-Acetat - Harnstoff 8 g C/l 7,5 g C/l 1,93 g N/l C/N = 8/1 zusätzlich: 0,5 g N/l aus Glutaminsäure, 0,5 g N/l aus Glycin
Feedinglösung	50 %ige Essigsäure/Harnstoff C/N = 8/1
Sideramin-bildungs-geschwindigkeit	200 h 17,3 mg/l·h (zunächst 125 h 19,2 mg/l·h, anschließend 13,9 mg/l·h; bei Abbruch der Fermentation 12-14 mg/l·h)

Fermentationen mit einem vergrößerten Acetatanteil im Nährmedium (Harnstoff als N-Quelle) - 12 g C/l aus Acetat und 4 g C/l aus Glucose - führten zu keiner Verbesserung der Sideraminbildungsgeschwindigkeit. Bei höheren Acetatkonzentrationen zeigte der Pilz Aspergillus viridi-nutans sowohl bei pH 6,4 als auch bei 7,0 stark reduziertes Wachstum und eine schlechte Sideraminproduktion. Die erreichten Sideraminbildungsgeschwindigkeiten lagen stets unter 10 mg/l·h.

4.1.2. Stärke als Kohlenhydrat

Auf Stärke statt Glucose als Kohlenhydratquelle zeigte Aspergillus viridi-nutans im Schüttelkolben sehr langsames Wachstum und nur eine mäßige Sideraminproduktion (Tabelle 2). Da infolge der negativen Korrelation zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Sideraminbildungsgeschwindigkeit im 20 l-Fermenter eine geringe Wachstumsgeschwindigkeit des Organismus zur Sideraminproduktion wünschenswert ist, wurde das Produktionsverhalten des Pilzes auf Stärke näher untersucht.

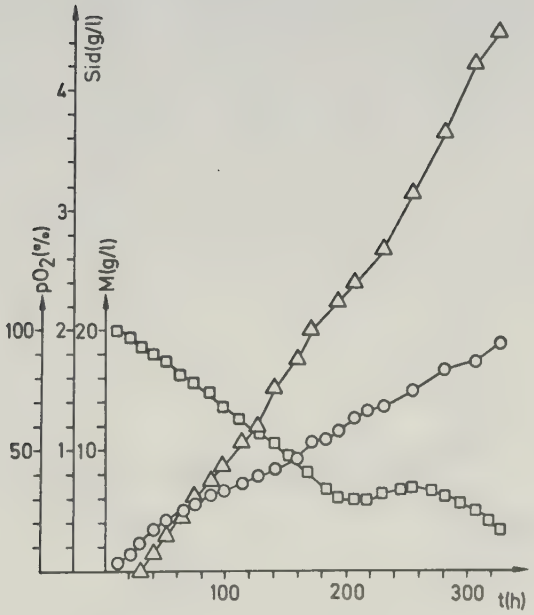
Das variierte Normalmedium enthielt 8 g C/l aus Stärke, 8 g C/l aus Acetat, 2 g N/l aus Ammoniumacetat, jeweils 0,5 g N/l aus Glutaminsäure bzw. Glycin sowie 2 g Hefeextrakt/l. Als Feedinglösung wurde ein Gemisch aus 50 %iger Essigsäure/Ammoniumacetat (C/N ≙ 18/1), das 1 % Hefeextrakt (w/v) enthielt, verwendet. Als Inoculum dienten 5 % einer Schüttelkolbenkultur auf einem variierten Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Harnstoff (1 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer; zusätzlich 10 g Na-Acetat/l sowie 1 g Hefeextrakt/l). Zur Fermentation im 20 l-Fermenter wurde abweichend von den allgemeinen Fermentationsbedingungen eine Belüftung von 0,7 vvm gewählt. Der Fermentationsverlauf ist in Abb. 7 dargestellt.

4.2. Feeding von Nährstoffen abhängig vom Sauerstoffpartialdruck in der Submerskultur

Bei Verknappung der Nährstoffe während der Fermentation steigt der Sauerstoffpartialdruck in der Submerskultur sprunghaft an. Bei Überschreiten des Sauerstoffmaximalwertes - des Sollwertes - wird Nährlösung zugefüttert; durch das erneut einsetzende Wachstum sinkt der Sauerstoffpartialdruck wieder unter den Sollwert.
Eine Fermentation mit vom Sauerstoffpartialdruck in der Submerskultur abhängigem Feeding von Nährstoffen wurde im 20 l-Fermenter (Typ B) mit horizontal in den Fermenterkessel eingebauter Sauerstoffelektrode durchgeführt.

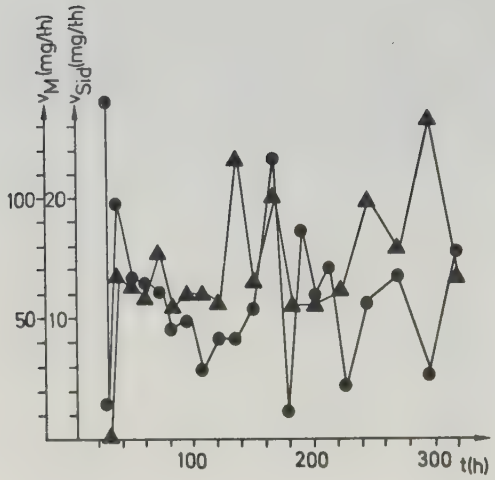
Abb. 7: Sideraminproduktion bei Aspergillus viridi-nutans bei Feeding von Nährstoffen über die pH-Regelung.

Variiertes Normalmedium: Stärke (8 g C/l), Acetat (8 g C/l), Ammoniumacetat (2 g N/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l), 2 g Hefeextrakt/l.
Feedinglösung: 50 % Essigsäure/Ammoniumacetat (C/N = 18/1), 1 % Hefeextrakt (w/v).
pH-Stat: pH 6,4 ± 0,05.



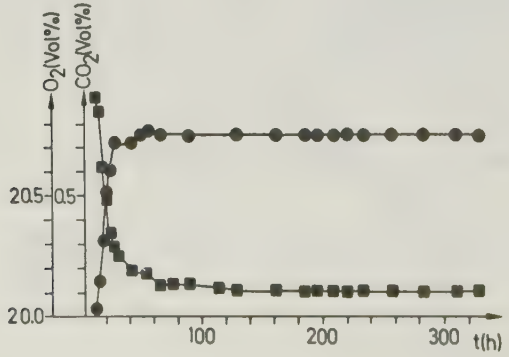
a) Wachstum, Sideraminbildung und Sauerstoffpartialdruck in der Submerskultur

△—△ Sid. (g/l), ○—○ M (g/l), □—□ pO_2 (%)



b) Wachstums- und Sideraminbildungsgeschwindigkeit

▲—▲ v_{Sid} (mg/l·h), ●—● v_M (mg/l·h)



c) Abluftanalyse

■—■ O_2 (Vol. %), ●—● CO_2 (Vol. %)

Auf einem variierten Normalmedium mit 8 g C/l aus Glucose, 8 g C/l aus Acetat und 2 g N/l aus Ammoniumacetat sowie 0,25 g N/l sowohl aus Glutaminsäure als auch aus Glycin, pH-statischer Fermentation (pH 6,4 ± 0,05) und Feeding von Essigsäure (50 %ig), Ammoniumacetat und Glucose (1 %, w/v) - C/N-Verhältnis von 18/1 - konnten bei einem Sauerstoffpartialdruck von 45 % über mehr als 400 h Sideraminbildungsgeschwindigkeiten von 11 mg/l·h erreicht werden. Der Fermenter wurde mit 50 ml einer Sporensuspension ($1 \cdot 10^8$ Sporen/ml Saline) angeimpft. Der Fermentationsverlauf ist in Abb. 8 dargestellt. Die Feed-Batch-Kulturen von Aspergillus viridi-nutans ermöglichen Desferri-Ferricrocinausbeuten von mehr als 5 g/l.

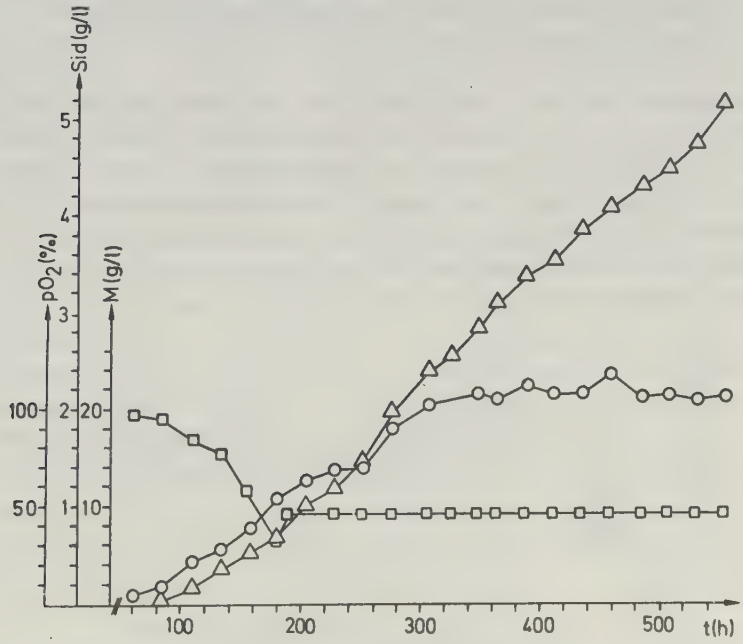


Abb. 8: Sideraminproduktion bei Aspergillus viridi-nutans bei Feeding von Nährstoffen abhängig vom Sauerstoffpartialdruck in der Submerskultur.

Variiertes Normalmedium: 8 g C/l aus Glucose, 8 g C/l aus Acetat, 2 g N/l aus Ammoniumacetat, 0,25 g N/l aus Glutaminsäure, 0,25 g N/l aus Glycin.
Feedinglösung: Essigsäure (50 %ig)/Ammoniumacetat/Glucose (1 %, w/v), C/N ≙ 18/1.

△—△ Sid. (g/l), ○—○ M (g/l), □—□ pO_2 (%)

B. UNTERSUCHUNG ZUR REGULATION DER SIDERAMINBIOSYNTHESE DURCH EISEN(III) BEI ASPERGILLUS VIRIDI-NUTANS

Sideramine werden nur bei Eisenmangel in großer Menge gebildet und ins Kulturmedium ausgeschieden. Für eine Sideraminproduktion im technischen Maßstab ist es von Bedeutung, Erkenntnisse über die Regulation der Biosynthese durch Eisen zu besitzen, um evt. gezielt nach Mutanten zu suchen, die auf billigen Medien mit "Eisenverunreinigungen" eine gute Sideraminproduktion zeigen.

1. Sideraminbiosynthese bei verschiedenen Eisen(III)-Konzentrationen im Nährmedium

Bei Zugabe von $FeCl_3$ zu 4 Tage alten Kulturen von Aspergillus viridi-nutans auf einem variierten Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer), die zu diesem Zeitpunkt $2\text{-}3\cdot10^{-4}$ Mol Desferri-Ferricrocin/l enthielten, wurde die in Abb. 9 dargestellte Abhängigkeit der Sideraminbiosynthese von der Fe(III)-Konzentration erhalten.

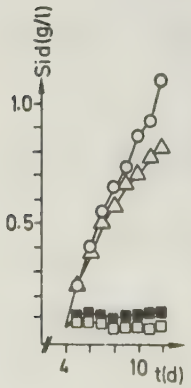


Abb. 9:

Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans in Gegenwart verschiedener Fe(III)-Konzentrationen.

Variiertes Normalmedium: Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer.

Fe(III)-Zugabe zu 4 Tage alten Kulturen

- keine Fe(III)-Zugabe
- 10^{-6} M Fe(III)
- 10^{-5} M Fe(III)
- 10^{-4} M Fe(III)

2. Untersuchung des zeitlichen Hemmverlaufes der Sideraminbiosynthese bei Aspergillus viridi-nutans nach Fe(III)-Sideramingaben

Im folgenden Versuch wurde die Kinetik der Sideraminbiosynthesehemmung nach Fe(III)-Sideramingaben untersucht. 4 Tage alte Kulturen von Aspergillus viridi-nutans auf einem variierten Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer), die etwa $2\text{-}3\cdot10^{-4}$ M an Desferri-Ferricrocin waren, wurden mit Fe(III) zu einer Konzentration von 10^{-4} Mol/l versetzt.
Als Maß für die Aufnahme des Fe(III)-Sideraminkomplexes ins Mycel diente die Extinktion des Kulturfiltrates bei 436 nm (nach der modifizierten Sideraminbestimmungsmethode ohne $FeCl_3$-Zugabe). Der Gesamtsideramingehalt im Kulturfiltrat wurde nach der modifizierten Sideraminbestimmungsmethode bestimmt. Die Differenz zwischen dem Gesamtsideramingehalt und dem Fe(III)-Sideramingehalt - ΔE^m - stellt den Anteil an eisenfreiem Sideramin im Kulturfiltrat dar. Die Differenz zwischen der Konzentration an eisenfreiem Sideramin zum Zeitpunkt y im Kulturmedium (ΔE^m_y) und zum Zeitpunkt x (ΔE^m_x) - wobei y nach x liegt - ist ein Maß für die Sideraminausscheidung des Mycels. (Fe(III)-Sideramin, das nach Aufnahme ins Mycel und Überführung in die Desferri-Verbindung evt. wieder ins Kulturmedium ausgeschieden wurde, wurde nicht von neugebildetem Sideramin unterschieden).
Für die Sideraminbildungsgeschwindigkeit zu verschiedenen Zeiten gilt:

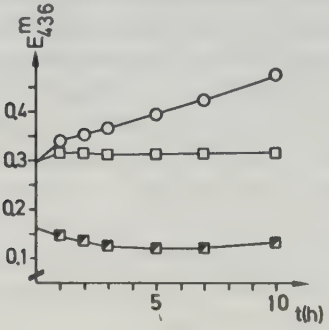
$$\frac{\Delta E^m_y - \Delta E^m_x}{\Delta h_{y-x}}$$

Die Ergebnisse sind in Abb. 10 dargestellt.

Bei Aspergillus viridi-nutans wurde die Sideraminausscheidung 4-6 h nach Fe(III)-Zugabe eingestellt.

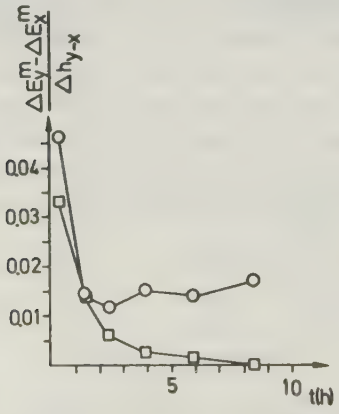
Abb. 10: Sideraminbildung von 4 Tage alten Aspergillus viridi-nutans-Kulturen in Gegenwart von Ferricrocin.

Schüttelkolbenversuch: variiertes Normalmedium: Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer.



a) Sideramingehalt im Nährmedium.

○—○ Kontrolle (keine Fe(III)-Zugabe)
□—□ 10^{-4} M Ferricrocin - Gesamtsideramingehalt im Kulturfiltrat
◪—◪ 10^{-4} M Ferricrocin - Ferricrocingehalt im Kulturfiltrat



b) Sideraminausscheidungsgeschwindigkeit

○—○ Kontrolle (keine Fe(III)-Zugabe)
□—□ 10^{-4} M Ferricrocin

Zur Klärung der Regulation der Sideraminbiosynthese durch Eisen wurde der "Eiseneffekt" in den folgenden Versuchen unter den verschiedensten Gesichtspunkten untersucht.

3. Wachstum und Atmung bei Aspergillus viridi-nutans bei unterschiedlichem Eisenangebot im Nährmedium

3.1. Wachstum und Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans im 20 l-Fermenter bei "Eisenmangel" und Eisenangebot

Bei Aspergillus melleus Yukawa fand man bei "Eisenmangel" eine erhöhte Ausscheidung von Säuren aus dem Citronensäurecyclus (EBERLE-HAEGI, 1966). Auch einige Enzyme liegen bei diesem Organismus bei Eisenangebot und Eisenmangel in unterschiedlicher Aktivität vor, so z.B. ist die Aktivität der Enzyme der Pyruvat- und α-Ketoglutaratdecarboxylierung bei Eisenangebot erhöht (CRUEGER, 1968; BARTH, 1972). Diese Befunde lassen auf eine Verschiebung von "Stoffwechselgleichgewichten" bei Eisenangebot und "Eisenmangel" schließen.
Um nähere Anhaltspunkte über die Art der Regulation der Sideraminbiosynthese durch Eisen zu gewinnen, wurden Wachstum, Sideraminbildung und Nährstoffabbau des Desferri-Ferricrocinproduzenten Aspergillus viridi-nutans in "Abwesenheit" von Eisen (bei Verwendung von analysenreinen Substanzen) und im Nährmedium mit $5 \cdot 10^{-5}$ Mol Fe(III)/l untersucht.

Der Pilz wurde im 20 l-Fermenter (Typ A) auf einem variierten Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Na-Acetat (8 g C/l), Harnstoff (2 g N/l)) gezüchtet. Als Inoculum dienten 50 ml einer Sporensuspension ($1 \cdot 10^{8}$ Sporen/ml Saline). In Abb. 11 ist der Fermentationsverlauf dargestellt.
Unter den Fermentationsbedingungen im 20 l-Fermenter war die Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes bei unterschiedlichem Eisenangebot gleich.

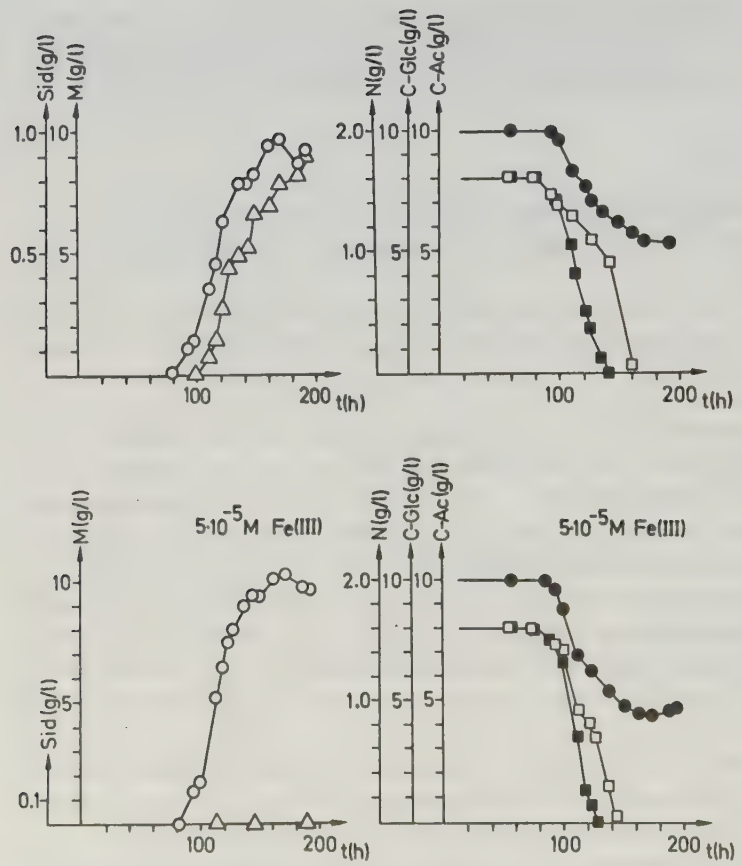


Abb. 11: Fermentation von Aspergillus viridi-nutans bei "Eisenmangel" und $5 \cdot 10^{-5}$ Mol Fe(III)/l.

20 l-Fermenter (Typ A); variiertes Normalmedium: Glucose (8 g C/l), Harnstoff (2 g N/l); pH-Stat: pH 6,4 ± 0,05.

○—○ M (g/l), △—△ Sid. (g/l), ●—● N (g/l), ■—■ C-Glc (g/l), □—□ C-Ac (g/l)

3.2. Atmungsaktivität von Aspergillus viridi-nutans bei verschiedenen Eisen(III)-Konzentrationen im Nährmedium

In der Atmungskette herrscht ein großer Bedarf an Eisen. Unter Eisenmangelbedingungen liegt möglicherweise eine weniger aktive Atmungskette und somit ein verminderter Sauerstoffverbrauch der Zellen vor. Da sowohl die Cytochrom-c-Oxydase als auch die postulierte Oxygenase der N-Hydroxylierung (STEVENS und EMERY, 1966) Sauerstoff benötigen, wäre eine Konkurrenz der Enzyme um das Substrat Sauerstoff denkbar, obwohl die kritische Fe(III)-Konzentration zur Einstellung der Sideraminproduktion sehr hoch - bei etwa $5 \cdot 10^{-5}$ M - liegt (Abb. 2). Bei Eisenmangel wäre die Oxygenase der N-Hydroxylierung in der Konkurrenz mit der Cytochrom-c-Oxydase um den Sauerstoff im Vorteil, und die Sideraminbiosynthese könnte auf vollen Touren laufen.

Die Atmungsaktivitäten von 4 Tage alten Kulturen auf einem variierten Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer) mit 10^{-6} bzw. 10^{-4} Mol Fe(III)/l sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Wachstum und Atmung von Aspergillus viridi-nutans bei unterschiedlichem Eisen(III)-Angebot im Nährmedium

Eisen(III) (Mol/l)	Myceltrockensubstanz (g/l)		Atmungsaktivität/ Mycelmasse (% O_2 min^{-1} g^{-1})	
10^{-4}	7,0	(100 %)	9,9	(100 %)
10^{-6}	4,6	(65,7 %)	8,5	(85,8 %)

Schüttelkolbenversuch: variiertes Normalmedium: Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer.

Aspergillus viridi-nutans zeigte im Schüttelkolbenversuch bei 10^{-6} bzw. 10^{-4} Mol Fe(III)/l große Unterschiede im Wachstum (bei vergrößertem Eisenangebot war die Wachstumsgeschwindigkeit größer, im Gegensatz zum Versuch im 20 l-Fermenter (Abb. 11)), aber nur geringfügige Unterschiede in der Atmungsaktivität.

Zur weiteren Überprüfung einer Regulation der Sideraminbiosynthese durch veränderte "Stoffwechselgleichgewichte" bei unterschiedlichem Eisenangebot wurde die Irreversibilität der Sideraminbiosynthesehemmung durch Eisen näher untersucht.
Bei einer Regulation der Sideraminproduktion durch veränderte "Stoffwechselgleichgewichte" bei Eisenangebot und "Eisenmangel" sollte man eine irreversible Hemmung der Sideraminbildung im Mycel nach Eisen(III)-Zugabe erwarten.

4. Ist die Hemmung der Sideraminbiosynthese durch Eisen(III) irreversibel?

Zur Beantwortung der Frage, ob Zellen, in denen die Sideraminbiosynthese unterdrückt ist, nach Übertragung auf eisenfreies Medium wieder Sideramine produzieren können, wurden Kulturen von Aspergillus viridi-nutans verschieden lange auf einem Nährmedium mit Eisen(III) herangezogen und anschließend auf eisenfreies Medium übertragen.

4 Tage alte Kulturen von Aspergillus viridi-nutans auf einem variierten Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer), die etwa $2\text{-}3 \cdot 10^{-4}$ Mol Sideramin/l enthielten, wurden zum Teil mit $FeCl_3$ zu einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ M versetzt. Das Mycel wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten im Fe(III)-Sideraminmedium auf eisenfreies Nährmedium übertragen (Abb. 12).

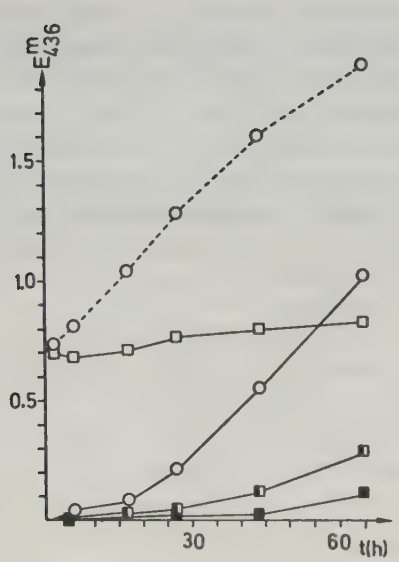


Abb. 12: Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans auf eisenfreiem Nährmedium nach verschieden langer Inkubation des Mycels auf Nährmedium mit $5 \cdot 10^{-5}$ Mol Ferricrocin/l.

Schüttelkolbenversuch: var. Normalmedium: Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer.

○··○ kein Fe(III) - Kontrolle, □—□ $5 \cdot 10^{-5}$ M Ferricrocin bei t = 0 h
Auf neues Nährmedium übertragenes Mycel
○—○ kein Fe(III) - Kontrolle, neues Medium nach 2 h
◧—◧ $5 \cdot 10^{-5}$ M Ferricrocin bei t = 0 h, eisenfreies Medium nach 2 h
■—■ $5 \cdot 10^{-5}$ M Ferricrocin bei t = 0 h, eisenfreies Medium nach 5 h

Mycel, das 2 h im Nährmedium mit $5 \cdot 10^{-5}$ Mol Fe(III)-Sideramin/l inkubiert wurde, zeigte nach Übertragung auf neues, eisenfreies Nährmedium nach 25 h wieder eine beachtliche Sideraminbildung. Hierbei tauchte die Frage auf, ob zur Aufhebung der Sideraminbiosynthesehemmung Mycelwachstum notwendig ist. Dieses Problem wurde im folgenden Versuch untersucht.

4 Tage alte Kulturen von Aspergillus viridi-nutans auf einem variierten Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer), die zu diesem Zeitpunkt etwa $3\text{-}4\cdot10^{-4}$ Mol Sideramin/l enthielten, wurden mit Eisen(III) bis zu einer Konzentration von $5\cdot10^{-5}$ Mol/l versetzt. Nach 2-stündiger Inkubation wurde das Mycel auf neues, eisenfreies Medium mit und ohne Glucose als Energie- und Hauptkohlenstoffquelle übertragen. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 dargestellt.

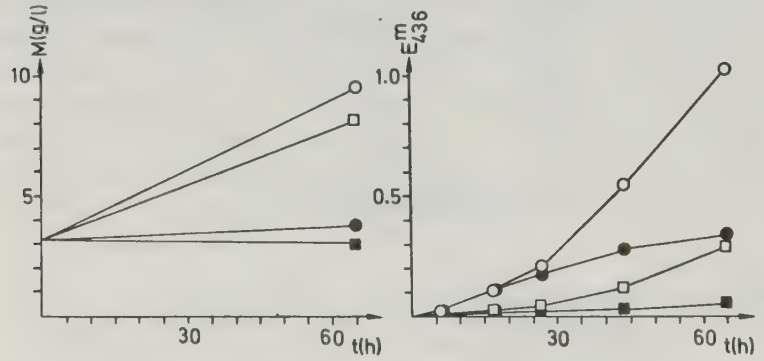


Abb. 13: Wachstum und Sideraminbildung von Mycel, dessen Sideraminbiosynthese durch 2-stündige Inkubation im Nährmedium mit $5\cdot10^{-5}$ Mol Ferricrocin/l gehemmt ist, nach Übertragung auf eisenfreies Nährmedium mit und ohne Glucose

Schüttelkolbenversuch: variiertes Normalmedium: Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer.

Kontrollversuche (Vorinkubation im eisenfreien Medium)
●—● Medium ohne Glucose, ○—○ Medium mit Glucose

"eisengehemmtes" Mycel (Vorinkubation im Medium mit $5\cdot10^{-5}$ Mol Ferricrocin/l)
■—■ Medium ohne Glucose, □—□ Medium mit Glucose

Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß nur bei ausreichender Versorgung mit Glucose und somit gutem Mycelwachstum eine ausgeprägte Sideraminbiosynthese möglich ist. "Eisengehemmtes" Mycel ließ nach 25 h im glucosehaltigen Nährmedium -

etwa nach Verdopplung der Mycelmasse - wieder eine gute Sideraminbildung erkennen.

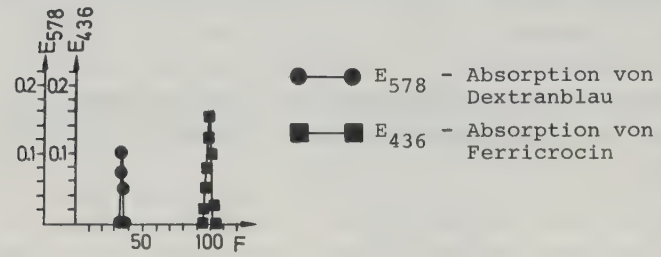
5. Untersuchung des Zellhomogenats von Aspergillus viridi-nutans auf ^{55}Fe-Verbindungen nach $^{55}Fe(III)$-Ferricrocin-gaben

Nachdem sich eine Regulation der Sideraminbiosynthese über eine Verschiebung von Stoffwechselgleichgewichten bei unterschiedlicher Eisenversorgung des Mycels als unwahrscheinlich herausstellte, wurde das Zellhomogenat von Aspergillus viridi-nutans nach Ferricrocingaben näher untersucht, um zu klären, ob eine direkte Regulation eines oder mehrerer Enzyme der Sideraminbildung durch Eisen als Ion (Fe^{2+} bzw. Fe^{3+}) oder als Metallkomplex (Fe(II)-X bzw. Fe(III)-X) vorliegt.

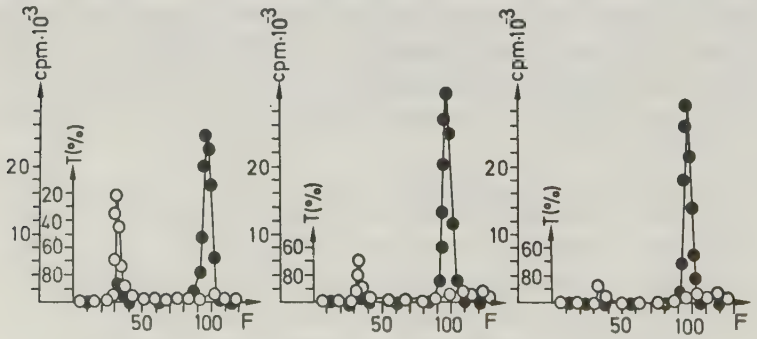
Mycel von 4 Tage alten Aspergillus viridi-nutans-Kulturen auf einem variierten Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer) wurde 3 h auf einem entsprechenden Medium mit $1 \cdot 10^{-4}$ Mol $^{55}Fe(III)$-Sideramin/l inkubiert. Nach gründlichem Waschen des Mycels erfolgte der Aufschluß mit der X-press. Das Homogenat wurde bei 2 500, 20 000 bzw. 60 000 g 1 h bei $4^{\circ}C$ zentrifugiert. Jeweils 2 ml der Zentrifugatsüberstände wurden auf einer Sephadex G-75-Säule bei $4^{\circ}C$ aufgetrennt. Die Elutionsprofile der Radioaktivität (cpm von ^{55}Fe) und der Proteine bzw. Peptide (Transmission bei λ = 280 nm, T (%)) sind in Abb. 14 dargestellt.

Die niedermolekularen Fraktionen 85-105 der Sephadex G-75 Chromatographie des 60 000 g-Überstandes wurden auf einer Bio-Gel P-2-Säule (200-400 mesh) erneut chromatographiert (Abb. 15).

Abb. 14: Chromatographie der verschiedentourig zentrifugierten Zellhomogenatsüberstände nach Inkubation des Mycels in $1 \cdot 10^{-4}$ Mol Ferricrocin/l.



a) Eichen der Sephadex G-75-Säule mit Dextranblau und Ferricrocin



2 500 g-Überstand 20 000 g-Überstand 60 000 g-Überstand

b) Sephadex G-75 Chromatographie
○—○ T (%), ●—● cpm

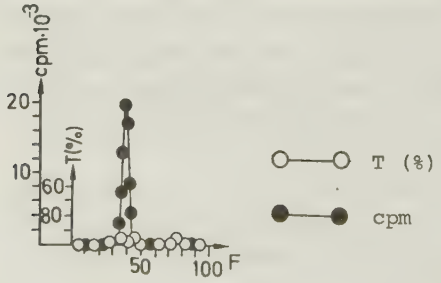


Abb. 15: Auftrennung der niedermolekularen Fraktionen des 60 000 g-Überstandes an Bio-Gel P-2 (200-400 mesh)

Während der 2 500 g-Überstand in der hochmolekularen Proteinfraktion, die im Ausschlußvolumen der Sephadex G-75-Säule wanderte, eine deutliche ^{55}Fe-Aktivität enthielt, war in der hochmolekularen Proteinfraktion des 20 000 g-Überstandes kaum mehr ^{55}Fe-Aktivität nachzuweisen. Der Hauptanteil der Radioaktivität lag als ^{55}Fe(III)-Ferricrocin vor, das an seiner orange-gelben Farbe zu erkennen war. Eine Chromatographie der niedermolekularen radioaktiven Fraktionen erbrachte keine weitere Auftrennung der ^{55}Fe-Aktivität. Es handelte sich ausschließlich um Ferricrocin.

Da Ferricrocin von Aspergillus viridi-nutans in relativ großen Mengen im Mycel angereichert wird, wäre eine regulatorische Funktion des Fe(III)-Sideraminkomplexes bei der Sideraminbiosynthese denkbar.

6. Hemmung der Sideraminbiosynthese durch metallanaloge Sideraminverbindungen

Zur Überprüfung einer direkten regulatorischen Funktion des Fe(III)-Sideraminkomplexes wurde die Sideraminproduktion in Gegenwart verschiedener dreiwertiger Metalle bzw. der metallanalogen Sideraminkomplexe untersucht.

6.1. Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans bei Zugabe von Fe(III), Al(III), Ga(III) bzw. V(III) zum Nährmedium

Wachstum und Sideraminbildung des Pilzes auf einem variierten Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer) in Gegenwart von Vanadium(III)chlorid, Gallium(III)chlorid, Aluminium-(III)sulfat bzw. Eisen(III)chlorid sind in Tabelle 7 aufgezeigt.

Tabelle 7: Wachstum und Sideraminbildung in Gegenwart von Fe(III), Al(III), V(III) bzw. Ga(III)

Metall	(Mol/l)	8. Tag Wachstum	8. Tag Sideramin (g/l)	12. Tag Wachstum	12. Tag Sideramin (g/l)
	0	++	0,54	++	0,97
Fe(III)	10^{-6}	++	0,6	++	1,0
	10^{-5}	++	0,24	+++	0,31
	10^{-4}	++	0	+++	0
Al(III)	10^{-6}	++	0,56	++	0,98
	10^{-5}	++	0,6	++	1,0
	10^{-4}	++	0,39	++	0,8
V(III)	10^{-6}	++	0,5	++	1,07
	10^{-5}	++	0,44	++	1,07
	10^{-4}	++	0,52	++	1,04
Ga(III)	10^{-6}	++	0,5	++	0,94
	10^{-5}	++	0,53	++	0,9
	10^{-4}	+	0,1	+	0,64

Schüttelkolbenversuch: var. Normalmedium: Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer.

Bewertung der Mycelmasse mit "+" bei mäßigem Wachstum bis "+++" bei gutem Wachstum.

Bei Al(III), Ga(III) und V(III) konnte bei einer Konzentration von 10^{-4} Mol/l keine dem Fe(III) entsprechende Hemmung der Sideraminbiosynthese beobachtet werden - im Gegensatz zur Desferri-Coprogenbiosynthese bei Neurospora crassa (WINKELMANN et al., 1973). (In den Versuchen mit V(III) lag möglicherweise V(V) im Medium vor, da V(III) sehr leicht zu V(V) oxidiert wird).

6.2. Sideraminbildung bei Zusatz metallanaloger Sideramine zu herangewachsenen Aspergillus viridi-nutans-Kulturen

Bei Zusatz verschiedener metallanaloger Sideramine zu 4 Tage alten Kulturen des Pilzes auf einem variierten Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer) ergab sich der in Abb. 16 dargestellte Verlauf der Sideraminproduktion.

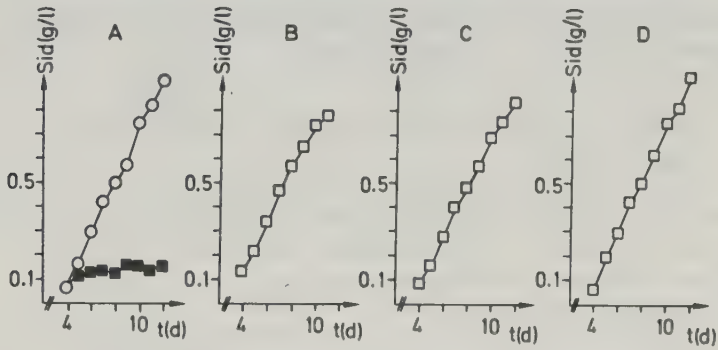


Abb. 16: Sideraminbildung bei Zugabe verschiedener metallanaloger Sideramine zu 4 Tage alten Aspergillus viridi-nutans-Kulturen

A: ○—○ keine Sideraminzugabe
■—■ 10^{-5} Mol Ferricrocin/l
B: □—□ 10^{-4} Mol Al(III)-Desferri-Ferricrocin (Alumicrocin)/l
C: □—□ 10^{-4} Mol Ga(III)-Desferri-Ferricrocin/l
D: □—□ 10^{-4} Mol V(III)-Desferri-Ferricrocin/l

Schüttelkolbenversuch: var. Normalmedium/ Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer.

Bei keinem der untersuchten metallanalogen Sideramine konnte unter den Versuchsbedingungen eine signifikante Beeinträchtigung der Sideraminbiosynthese festgestellt werden, wie sie bei einer direkten regulatorischen Funktion des Ferricrocinkomplexes zu erwarten wäre.

6.3. Vergleichende Studien zur Sideraminproduktion bei Aspergillus viridi-nutans in Gegenwart von Fe(III) und Al(III)

Die räumliche Struktur von Alumichrom ist der des Ferrichroms sehr ähnlich (LLINAS et al., 1970). Da Al(III) nicht durch Reduktion aus dem Sideraminkomplex - infolge geringerer Komplexbindungskonstante der Metall(II)-Form - herausgelöst werden kann, wurde die Desferri-Ferricrocin-Produktion in Gegenwart von Al(III) näher untersucht.

6.3.1. Hemmung der Sideraminbiosynthese durch Al(III) bzw. Fe(III)

Aspergillus viridi-nutans wurde bei unterschiedlichem Fe(III)- bzw. Al(III)-Gehalt des Nährmediums kultiviert. Abb. 17 zeigt den Verlauf des Sideramingehaltes im Kulturfiltrat während der Fermentation.
In Gegenwart von 10^{-4} M Fe(III) bzw. 10^{-3} M Al(III) ließ sich im Kulturfiltrat kein Sideramin mehr nachweisen.

6.3.2. Untersuchung des intrazellulären Sideramingehaltes bei Angebot von Fe(III) bzw. Al(III)

Mycel von Aspergillus viridi-nutans-Kulturen, die verschieden lange auf einem variierten Normalmedium mit 10^{-3} Mol Al(III)/l bzw. 10^{-4} Mol Fe(III)/l herangezogen worden waren, wurde abzentrifugiert, mit Wasser gut gewaschen und eingefroren; nach dem Auftauen wurde das gut gekühlte Mycel ($0^{o}C$) mit einem Stabmixer 60 sec homogenisiert. Die Mycelbruchstücke wurden abzentrifugiert, das Filtrat auf ein dem ursprünglichen Kulturfiltrat entsprechendes Volumen mit Wasser aufgefüllt und eine modifizierte Sideraminbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 18 dargestellt.

Der Al(III)-Sideraminkomplex wurde im Mycel angereichert, ohne die Sideraminproduktion zu beeinflussen. Eine Unterdrückung der Sideraminbiosynthese durch Al(III) (Abb. 17)

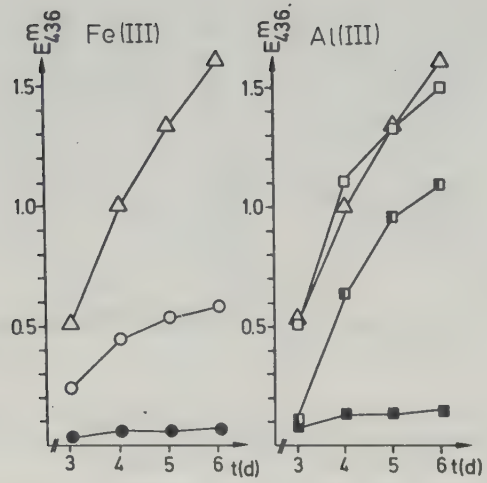


Abb. 17: Sideraminproduktion in Gegenwart von Fe(III) bzw. Al(III)

Schüttelkolbenversuch: var. Normalmedium: Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer; zusätzlich 1 g Hefeextrakt/l.

wurde somit nur vorgetäuscht.

Im folgenden Versuch konnte eindeutig bewiesen werden, daß bei Aspergillus viridi-nutans nach vollständiger Aufnahme des Al(III) als Alumicrocin ins Mycel die Desferri-Ferricrocin-Ausscheidungsgeschwindigkeit dem Kontrollwert ohne Al(III) entspricht.

3 Tage alte Aspergillus viridi-nutans-Kulturen auf einem variierten Normalmedium, die etwa $2 \cdot 10^{-4}$ M an Desferri-Ferricrocin waren, wurden mit Al(III) zu 10^{-4} bzw. 10^{-3} M ver-

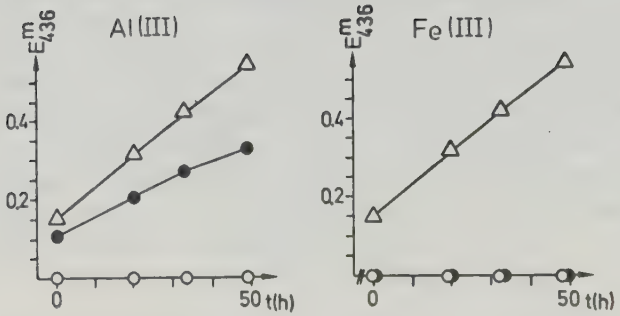


Abb. 18: Sideramingehalt im Kulturfiltrat und im Mycel (auf Kulturfiltratvolumen bezogen) bei Anwesenheit von Al(III) bzw. Fe(III) im Nährmedium

△—△ Kontrolle, ●—● interner Sideramingehalt,
○—○ externer Sideramingehalt

Schüttelkolbenversuch; variiertes Normalmedium: Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer; zusätzlich 1 g Hefeextrakt/l.

setzt. Der Verlauf des Sideramingehaltes im Kulturfiltrat ist in Abb. 19 aufgezeigt.

6.3.3. Regulation des Sideraminaufnahmesystems

Der Pilz Aspergillus viridi-nutans wurde auf einem variierten Normalmedium, das 10^{-5} M an Al(III) bzw. Fe(III) war, angezogen. Zu 3 Tage alten Kulturen wurde Fe(III) bzw. Al(III) zu einer Molarität von 10^{-3} gegeben und der Verlauf des Sideramingehaltes im Kulturfiltrat untersucht (Abb. 20).

Ferricrocin wurde im Gegensatz zu Alumicrocin nur zu einem geringen Teil ins Mycel aufgenommen.

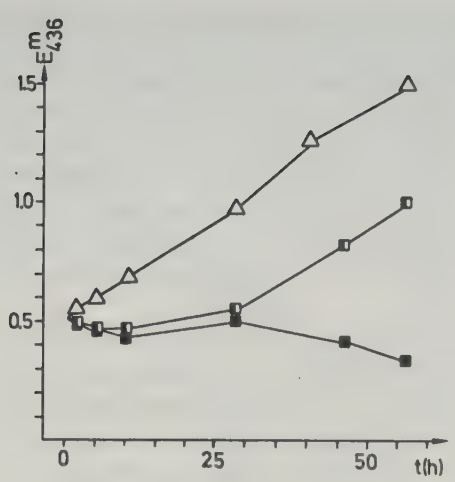


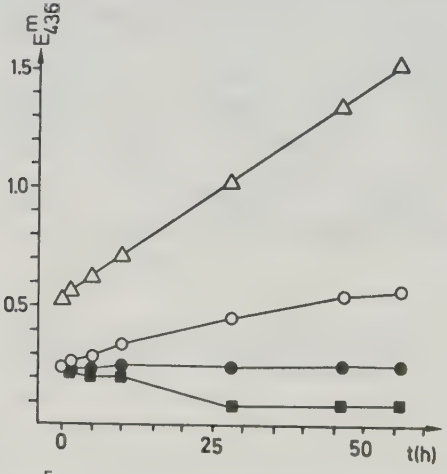
Abb. 19: Sideramingehalt im Kulturfiltrat bei Zugabe von Al(III) zu 3 Tage alten Aspergillus viridi-nutans-Kulturen

△—△ Kontrolle, ◧—◧ 10^{-4} M Al(III)
■—■ 10^{-3} M Al(III)

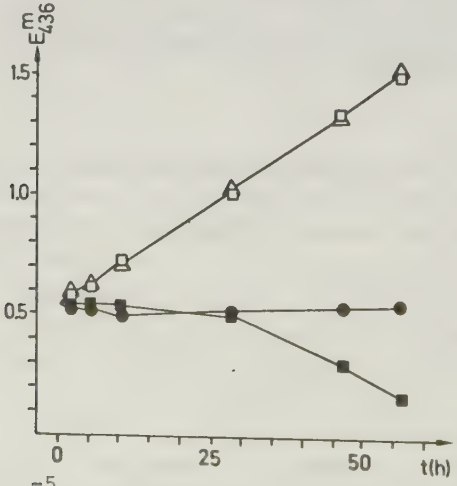
Schüttelkolbenversuch: variiertes Normalmedium: Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer; zusätzlich 1 g Hefeextrakt/l.

Zur Regulation des Sideraminaufnahmesystems bei Aspergillus viridi-nutans ist die Freisetzung von Eisen aus Ferricrocin Voraussetzung, da Alumicrocin überhaupt nicht regulatorisch wirksam ist.

Abb. 20: Regulation der Ferricrocin- bzw. Alumicrocinaufnahme bei Aspergillus viridi-nutans (Sideramingehalt im Kulturfiltrat nach Zugabe von Fe(III) bzw. Al(III) zu 3 Tage alten Kulturen)



a) Anzucht in 10^{-5} M Fe(III)
△—△ Kontrolle (ohne Fe(III)), ○—○ Kontrolle - 10^{-5} M Fe(III); ●—● 10^{-5} M Fe(III) : 10^{-3} M Fe(III) am 3. Tag; ■—■ 10^{-5} M Fe(III) : 10^{-3} M Al(III) am 3. Tag.



b) Anzucht in 10^{-5} M Al(III)
△—△ Kontrolle (ohne Al(III)), □—□ Kontrolle - 10^{-5} M Al(III); ●—● 10^{-5} M Al(III) : 10^{-3} M Fe(III) am 3. Tag; ■—■ 10^{-5} M Al(III) : 10^{-3} M Al(III) am 3. Tag.

7. Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans in vitro

Nachdem sich eine Regulation der Sideraminbiosynthese durch allosterische Kontrolle eines oder mehrerer Enzyme des Multienzymkomplexes durch Ferricrocin als unzutreffend herausstellte und ein Abbau der "Sideraminsynthetase" in Gegenwart von Eisen nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde das Hexapeptidsynthetasesystem von Aspergillus viridi-nutans in vitro näher untersucht.

Mycel von 4 Tage alten Aspergillus viridi-nutans-Kulturen auf einem Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Asparagin (1 g N/l)) wurde durch Ultraschall aufgeschlossen, das Homogenat zentrifugiert und der Zentrifugationsüberstand als Enzymrohextrakt in den Inkubationsansatz eingesetzt.
Nach einer Adsorptionschromatographie der Sideramine an Amberlite XAD-2 (300-1000 µ) wurde das Sideramineluat dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelplatten im Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser (65/25/4) aufgetrennt. Die Radioaktivitätsverteilung auf der Platte ist in Abb. 21 zu sehen.

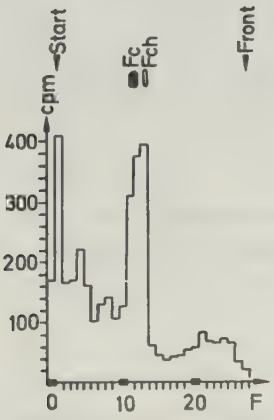
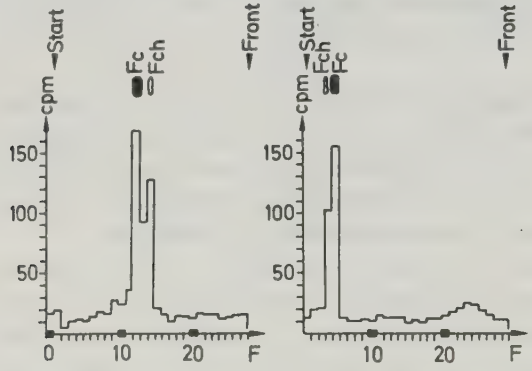


Abb. 21: Einbau von ^{14}C-Glycin in Sideramine in vitro
Sideraminbanden auf der Kieselgelplatte und Radioaktivitätsverteilung nach der 1. Dünnschichtchromatographie des Amberlite XAD-2-Eluats (Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser ≙ 65/25/4).

Die Ferricrocin- und Ferrichrombande wurden zusammen aus der Kieselgelplatte ausgekratzt, die Sideramine eluiert und jeweils die Hälfte des Eluats im Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser (65/25/4) bzw. n-Propanol/Eisessig/Wasser (4/1/1) erneut auf Kieselgelplatten dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (Abb. 22).



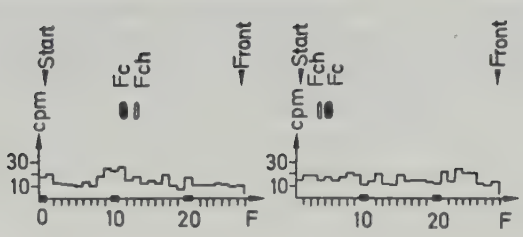
Chloroform/Methanol/Wasser (65/25/4)

n-Propanol/Eisessig/Wasser (4/1/1)

Abb. 22: Einbau von ^{14}C-Glycin in Sideramine in vitro
Sideraminbanden und Radioaktivitätsverteilung auf der Kieselgelplatte nach der 2. Dünnschichtchromatographie des Amberlite XAD-2-Eluats.

Enthielt der Inkubationsansatz kein ATP, so ergab sich bei der 2. dünnschichtchromatographischen Untersuchung der Sideraminfraktionen die in Abb. 23 dargestellte Radioaktivitätsverteilung.

Die Ergebnisse zeigten einen deutlichen - wenn auch geringen - Einbau von ^{14}C-Glycin bei Aspergillus viridi-nutans in Sideramine in vitro. Bei Kontrollexperimenten ohne ATP im Inkubationsansatz wurde kein ^{14}C-Glycin-Einbau in Sideramine gefunden.



Chloroform/Methanol/Wasser (65/25/4) n-Propanol/Eisessig/Wasser (4/1/1)

Abb. 23: Einbau von ^{14}C-Glycin in Sideramine in vitro (Inkubationsansatz ohne ATP)

Sideraminbande auf der Kieselgelplatte und Radioaktivitätsverteilung nach der 2. Dünnschichtchromatographie

Im folgenden Versuch wurde der direkte Einfluß von Ferricrocin auf das Enzymsystem der Hexapeptidsynthese in vitro untersucht. Es wurde durch Ultraschall aufgeschlossenes Mycel verwendet. Zum Inkubationsansatz wurden 100 µl einer 10^{-2} M Ferricrocinlösung gegeben und der ^{14}C-Glycin-Einbau in die Sideramine gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: ^{14}C-Glycin-Einbau in Sideramine in vitro bei Aspergillus viridi-nutans

Zusatz zum Inkubationsansatz	Desferri-Ferricrocin Einbau		Desferri-Ferrichrom Einbau	
	dpm	(%)	dpm	(%)
---	700	0,0032	400	0,0018
1 µMol Ferricrocin	750	0,0034	200	0,0009

Die in Tabelle 8 aufgeführten ^{14}C-Glycin-Einbauraten in Sideramine stellen Mittelwerte aus Parallelversuchen dar. Die Radioaktivität wurde jeweils nach der 1. Dünnschichtchromatographie im LSC bestimmt.

Nachdem Ferricrocin ($\approx 10^{-4}$M) in vitro unter den Versuchsbedingungen keine Aktivitätsänderung der Hexapeptidsynthetase bewirkte, was den früheren Ergebnissen entsprach (III.B 6.), wurden 4 Tage alte Aspergillus viridi-nutans-Kulturen, die auf einem Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Asparagin (1 g N/l)) mit 10^{-4} Mol Fe(III)/l angezogen wurden, auf Hexapeptidsynthetaseaktivität in vitro untersucht. Der Aufschluß des Mycels erfolgte im Mörser. Der Einbau von ^{14}C-Glycin in Desferri-Ferricrocin ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: ^{14}C-Glycin-Einbau in Desferri-Ferricrocin bei Aspergillus viridi-nutans in vitro nach Anzucht der Kulturen in einem Nährmedium mit 10^{-4} Mol Fe(III)/l

Nährmedium	^{14}C-Glycin-Einbau dpm
"Asparagin-Normalmedium"	670
"Asparagin-Normalmedium" 10^{-4} M Fe(III)	750

In Mycel, dessen Sideraminbiosynthese durch 10^{-4} Mol Fe(III)/l im Kulturmedium unterdrückt war, konnte bei Aspergillus viridi-nutans in vitro stets eine Hexapeptidsynthetaseaktivität nachgewiesen werden.

Wurde ^{14}C-Ornithin statt ^{14}C-Glycin als radioaktive Vorstufe zur Hexapeptidsynthese angeboten, so konnte keine Radioaktivität in der Sideraminfraktion festgestellt werden.

Bei Zugabe von δ-N-Hydroxy-L-ornithin (50 µl ≙ 100 µMol) zum Inkubationsansatz wurde keine Steigerung der Sideraminbiosynthese festgestellt. Wurde δ-N-Acetyl-δ-N-hydroxy-L-ornithin (50 µl ≙ 25 µMol) zum Inkubationsansatz gegeben, so konnte in einigen Fällen eine Verdopplung des Einbaus von ^{14}C-Glycin in die Sideramine festgestellt werden.

8. NADH:Ferricrocin-Oxidoreduktase

Nachdem sich in Mycel von Aspergillus viridi-nutans, dessen Sideraminbiosynthese durch 10^{-4} M Fe(III) unterdrückt war, stets eine deutliche Sideraminsynthetaseaktivität (Hexapeptidsynthetase) in vitro nachweisen ließ - im Gegensatz zu Untersuchungen bei anderen Organismen, z.B. bei Fusarium cubense die Fusigensynthetase (ANKE et al., 1973), bei Rhodotorula glutinis die Rhodotorulasäuresynthetase (ANKE und DIEKMANN, 1972) - sollten Aspergillus viridi-nutans-Kulturen, die bei verschiedenem Fe(III)-Angebot herangezogen wurden, auf eine Ferricrocin-Reduktaseaktivität näher untersucht werden.
Da die Versuche zur Regulation der Hexapeptidsynthetaseaktivität sehr für eine direkte Regulation eines oder mehrerer Enzyme des Multienzymkomplexes durch Eisen sprechen, was später noch ausführlich diskutiert wird, war es interessant zu klären, ob das Enzym, das Eisen aus dem Sideraminkomplex durch Reduktion freisetzt (der Komplex des Desferri-Sideramins mit Fe(II) ist wesentlich instabiler als der Fe(III)-Sideraminkomplex, $K \approx 10^{8}$ gegen 10^{30}), einer ähnlichen Regulation unterliegt.

Die Fe(III)-Sideramin-Reduktaseaktivität wurde nach dem Testsystem von BROWN und RATLEDGE (1975) bestimmt, in dem enzymatisch reduziertes Fe(II) von EDTA in einem farblosen Komplex gebunden wird. Die Enzymaktivität läßt sich einfach anhand der Extinktionsabnahme des Fe(III)-Sideraminkomplexes bei 436 nm bestimmen.

Die Ferricrocin-Oxidoreduktase von Aspergillus viridi-nutans benötigt als Cofaktor NADH. Mit NADPH erfolgt die Reduktion wesentlich langsamer, wie in Tabelle 10 gezeigt wird. Ohne EDTA im Testansatz erfolgt keine Freisetzung des Eisens aus dem Sideraminkomplex.
Da der 12 000 g- und der 48 000 g-Überstand die gleiche Enzymaktivität zeigten, wurde stets der 48 000 g-Überstand mit der größeren spezifischen Aktivität eingesetzt.

Unter den Bedingungen des Testansatzes erfolgt bei 27°C eine schwache nichtenzymatische Reduktion des Fe(III) im Ferricrocinkomplex. Sehr stark ins Gewicht fällt die nichtenzymatische Reduktion bei 37°C.
Das Enzym besitzt kein scharfes Temperaturoptimum. Bei 37°C ist die Enzymaktivität geringfügig größer als bei 27°C.

Tabelle 10: Ferricrocin-Reduktase

Testansatz	Reaktionszeit (min)	reduziertes Ferricrocin n Mol/mg Protein	%
ohne NADH	40	7,7	41,4
NADH	40	18,6	100
NADPH	40	9,2	49,5
ohne EDTA	40	0	0

Inkubationstemperatur: 27°C

Zur Untersuchung der Spezifität der NADH:Sideramin-Oxidoreduktase wurde die Reduktion von Fe(III) in Ferricrocin und Coprogen, das von Aspergillen sehr schlecht aufgenommen wird (WIEBE und WINKELMANN, 1975), bestimmt (Abb. 24).

Der Ferricrocinkomplex wurde besser reduziert als der Coprogenkomplex. Die Tatsache, daß auch ohne NADH-Zugabe eine Dekomplexierung der eingesetzten Sideramine eintritt, deutet auf das Vorhandensein von Reduktionsäquivalenten im Enzymrohextrakt hin.

Mycel, das in Gegenwart von 10^{-4} M Fe(III) herangezogen wurde, zeigte eine NADH:Ferricrocin-Oxidoreduktase-Aktivität, die dem "eisenfreien" Mycel entspricht (Tabelle 11).

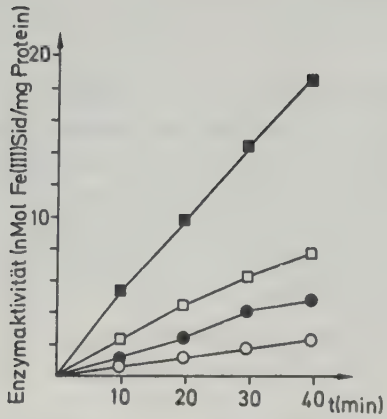


Abb. 24: NADH:Sideramin-Oxidoreduktase bei Aspergillus viridi-nutans

Ferricrocin: ■—■ Testansatz mit NADH
□—□ Testansatz ohne NADH
Coprogen : ●—● Testansatz mit NADH
○—○ Testansatz ohne NADH

Inkubationstemperatur: 27°C

Tabelle 11: NADH:Ferricrocin-Oxidoreduktase aus Mycel, das bei "Eisenmangel" bzw. 10^{-4} M Eisen(III) angezogen wurde

Fe(III) (Mol/l)	Testansatz	Reaktionszeit (min)	reduziertes Ferricrocin n Mol/mg Protein	%
0	NADH	40	18,6	100
0	ohne NADH	40	9,2	49,5
10^{-4}	NADH	40	17,0	91,4
10^{-4}	ohne NADH	40	10,0	53,8

Inkubationstemperatur: 27°C.

C. UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE DES δ-N-HYDROXY-L-ORNITHINS

Stickstoff in der Oxidationsstufe -1 findet man in biologischen Systemen z.B. als Hydroxylaminogruppe. Der mögliche Biosyntheseweg, besonders im Hinblick auf die Herkunft des Sauerstoffs, wurde erst an wenigen Beispielen untersucht (AKERS et al., 1972; STEVENS und EMERY, 1966). Grundsätzlich gibt es für die Entstehung der Hydroxylaminogruppe mehrere Möglichkeiten (STEVENS und EMERY, 1966):

a) direkte Oxidation einer Aminogruppe
b) Reduktion einer Nitrogruppe
c) 2-Elektronen-Reduktion eines Oxims nach Kondensation von Hydroxylamin mit einer Ketogruppe
d) Hydratation einer Iminogruppe
e) Addition von Hydroxylamin an eine Doppelbindung

Sideramine vom Ferrichromtyp enthalten δ-N-Hydroxy-L-ornithin.

Zur Untersuchung der Frage, ob eine Entstehung von δ-N-Hydroxy-L-ornithin durch Anlagerung von Hydroxylamin an die Ketogruppe von Glutaminsäure-γ-semi-aldehyd möglich ist, wurde die Sideraminbildung des Desferri-Ferricrocinproduzenten Aspergillus viridi-nutans nach Hydroxylamingaben zum Nährmedium näher untersucht.

1. Sideraminbiosynthese bei Aspergillus viridi-nutans in Gegenwart von Hydroxylamin

1.1. Zugabe von Hydroxylamin zu verschiedenen Nährmedien

Variiertes Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Stickstoffquelle (1 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer), das verschiedene Stickstoffquellen enthielt, wurde mit jeweils 100 mg Hydroxylamin/l versetzt. Die Sideraminproduktion auf den verschiedenen Nährmedien ist in Abb. 25 dargestellt. Hydroxylamin in einer Konzentration von 100 mg/l verzögert etwas die Sporenkeimung und beeinträchtigt geringfügig das Wachstum des Pilzes.

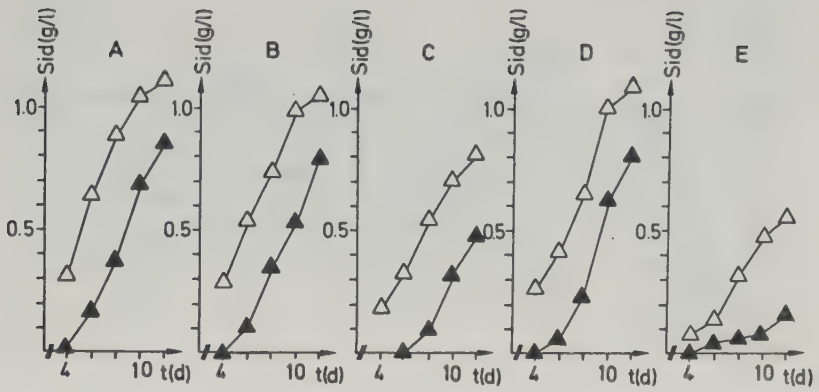


Abb. 25: Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans auf verschiedenen Stickstoffquellen nach Zugabe von Hydroxylamin zum Nährmedium

△—△ Sid. (g/l) - Medium ohne Hydroxylamin
▲—▲ Sid. (g/l) - Medium mit 100 mg Hydroxylamin/l

Schüttelkolbenversuch: variiertes Normalmedium: Glucose (8 g C/l) Stickstoffquelle (1 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer

Stickstoffquellen: A - Glutaminsäure, B - Glutaminsäure/Glycin, C - Ornithin, D - Ornithin/Glycin, E - Harnstoff

1.2. Hydroxylaminverfütterung an herangewachsene Aspergillus viridi-nutans-Kulturen

4 Tage alte Kulturen von Aspergillus viridi-nutans auf einem variierten Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer) wurden mit verschiedenen Mengen Hydroxylamin versetzt. Die Sideraminbildung ist in Abb. 26 dargestellt.

In keinem Fall konnte eine Steigerung der Sideraminbiosynthese in Gegenwart von Hydroxylamin festgestellt werden. Bei Hydroxylaminkonzentrationen >100 mg/l war die Sideraminbiosynthesegeschwindigkeit vermindert, da in solch hohen Konzentrationen Hydroxylamin toxisch auf den Organismus wirkte.

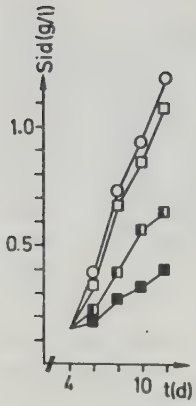


Abb. 26:

Sideraminbildung bei Zugabe von Hydroxylamin zu 4 Tage alten Kulturen.

○—○ 0 mg Hydroxylamin/l, □—□ 100 mg Hydroxylamin/l, ◧—◧ 200 mg Hydroxylamin/l, ■—■ 500 mg Hydroxylamin/l.

Schüttelkolbenversuch: var. Normalmedium: Glucose (8 g C/l), Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer.

2. Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans auf Ornithin als Stickstoffquelle

Nachdem durch Hydroxylamingaben zu Aspergillus viridi-nutans-Kulturen die Sideraminproduktion nicht erhöht werden konnte und somit die Biosynthese von δ-N-Hydroxy-L-ornithin durch Reaktion von Glutaminsäure-γ-semi-aldehyd mit Hydroxylamin wenig wahrscheinlich wurde, wurde die Sideraminproduktion des Pilzes auf Ornithin als Stickstoffquelle näher untersucht.

2.1. Sideraminbildung auf Ornithin im Schüttelkolben

Die Kultivierung des Pilzes erfolgte im Schüttelkolben auf einem variierten Normalmedium mit Ornithin bzw. Ornithin/Glycin als Stickstoffquellen. Die Sideraminbildung ist in Abb. 27 dargestellt.
Auf Ornithin als Stickstoffquelle zeigte der Pilz eine ausgezeichnete Sideraminproduktion.

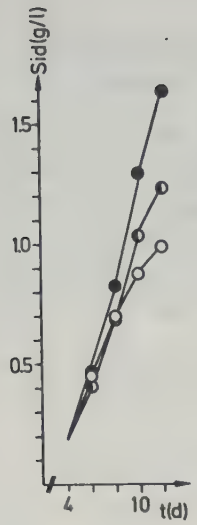


Abb. 27:

Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans auf Ornithin als Stickstoffquelle.

◐—◐ Ornithin/Glycin (0,5 g N/l, 0,5 g N/l)
●—● Ornithin/Glycin (1,0 g N/l, 1,0 g N/l)
○—○ Ornithin (1,0 g N/l).

Schüttelkolbenversuch: var. Normalmedium: Glucose (8 g C/l) in 1/15 M Phosphatpuffer

2.2. Sideraminbildung bei Aspergillus viridi-nutans auf Ornithin im 20 l-Fermenter

Der Fermentationsverlauf bei Aspergillus viridi-nutans auf Ornithin als Stickstoffquelle im 20 l-Fermenter (Typ A) ist in Abb. 28 dargestellt. Ein variiertes Normalmedium mit Glucose (8 g C/l), Acetat (8 g C/l), Ammoniumacetat (0,5 g N/l), Glycin (1 g N/l) und Ornithin (2 g N/l) fand Verwendung. Die Fermentation erfolgte pH-statisch (pH 6,4). Der Fermenter wurde mit 5 % einer 4 Tage alten Schüttelkolbenkultur auf einem variierten Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Harnstoff (1 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer; zusätzlich 10 g Na-Acetat/l, 1 g Hefeextrakt/l) angeimpft.

Der Pilz zeigte auf dem "Ornithin-Medium" unter den normalen Sideraminfermentationsbedingungen 35 h lang eine beachtliche durchschnittliche Sideraminbildungsgeschwindigkeit von 18,7 mg/l·h.

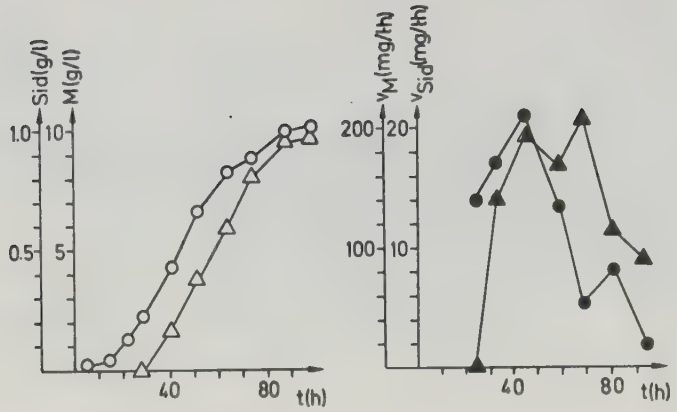


Abb. 28: Fermentation von Aspergillus viridi-nutans auf Ornithin als Stickstoffquelle im 20 l-Fermenter

△—△ Sid. (g/l), ○—○ M (g/l), ▲—▲ $V_{Sid.}$ (mg/l·h), ●—● V_M (mg/l·h)

20 l-Fermenter (Typ A), pH-Stat: pH 6,4; var. Normalmedium: Glucose (8 g C/l), Acetat (8 g C/l), Ammoniumacetat (0,5 g N/l), Glycin (1 g N/l), Ornithin (2 g N/l).

Die obigen Versuche machen eine direkte Hydroxylierung der δ-Aminogruppe von Ornithin sehr wahrscheinlich.

In den folgenden Versuchen wurde die Regulation der Ornithin-Biosynthese bei Aspergillus viridi-nutans näher untersucht.

3. Regulation der Ornithin-Biosynthese bei Aspergillus viridi-nutans

Die Biosynthese von Ornithin verläuft ausgehend von α-Ketoglutarat aus dem Citronensäurecyclus über Glutaminsäure zu Ornithin. Bei zahlreichen Organismen hemmt Arginin - das Endprodukt der Biosynthesekette - durch einen Feedback-Mechanismus Enzyme in der Ornithinbiosynthesekette nach Glutaminsäure.

3.1. Sideraminbiosynthese bei Aspergillus viridi-nutans in Gegenwart von Arginin

Bei Kultivierung des Pilzes auf einem variierten Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Stickstoffquelle (1 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer) mit Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) bzw. Ornithin/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) alleine bzw. zusammen mit Arginin (1 g N/l) wurden die in Abb. 29 dargestellten Sideraminausbeuten erhalten.

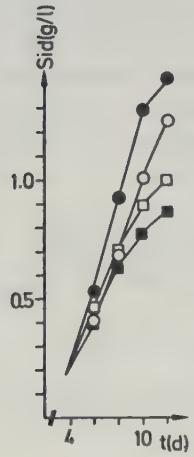


Abb. 29:

Sideraminproduktion bei Aspergillus viridi-nutans auf Glutaminsäure bzw. Ornithin in Gegenwart von Arginin.

○—○ Ornithin/Glycin (jeweils 0,5 g N/l)
●—● Ornithin/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) + Arginin (1 g N/l)
□—□ Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l)
■—■ Glutaminsäure/Glycin (jeweils 0,5 g N/l) + Arginin (1 g N/l).

Schüttelkolbenversuch: var. Normalmedium: Glucose (8 g C/l), Stickstoffquelle (1 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer

Arginin hemmt bei Glutaminsäure/Glycin als N-Quelle die Sideraminproduktion; bei Ornithin/Glycin ist in Gegenwart von Arginin im Vergleich zum Kontrollmedium ohne Arginin eine Steigerung der Sideraminbiosynthese festzustellen.

Zur näheren Untersuchung des "Argininеffektes" auf die Sideraminbiosynthese bei Glutaminsäure als N-Quelle wurde im folgenden Versuch der Pilz auf einem variierten Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Harnstoff (1 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer; zusätzlich 0,5 g Hefeextrakt/l) angezogen; 3 Tage alte Kulturen wurden mit Glutaminsäure bzw. Glutaminsäure/Arginin zu einer Molarität von jeweils 10^{-2} versetzt.

Der Verlauf der Sideraminproduktion ist in Abb. 30 dargestellt.

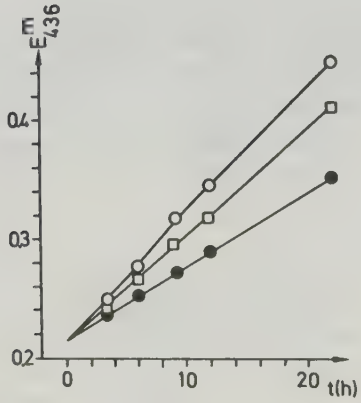


Abb. 30: Sideraminproduktion bei Aspergillus viridi-nutans nach Zugabe von Glutaminsäure bzw. Glutaminsäure/Arginin zu 3 Tage alten Kulturen auf einem "Harnstoff-Medium".

□—□ Kontrolle, ○—○ Glutaminsäure (10^{-2}M), ●—● Glutaminsäure/Arginin (10^{-2}M).

Schüttelkolbenversuch: var. Normalmedium: Glucose (8 g C/l), Harnstoff (1 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer; zusätzlich 0,5 g Hefeextrakt/l.

3.2. Einbau von ^{14}C-Glutaminsäure in Desferri-Ferricrocin in Gegenwart von Arginin in vivo

Um den Hemmeffekt von Arginin auf die Ornithin- und somit auf die Desferri-Ferricrocinbiosynthese exakt nachzuweisen, wurde der Einbau von ^{14}C-Glutaminsäure in Desferri-Ferricrocin in Gegenwart verschiedener Argininkonzentrationen gemessen.

Das Mycel von jeweils 2 Kolben - 8 Tage alter - Aspergillus viridi-nutans-Kulturen auf einem variierten Normalmedium (Glucose (8 g C/l), Harnstoff (1 g N/l) in 1/15 M Phosphatpuffer) wurde vereinigt und in 500 ml-N-Kolben mit 100 ml

einer 0,1 %igen Glucoselösung aufgenommen. 1 µCi ^{14}C-Glutaminsäure (0,1 µMol), 1 µMol Serin, 1 µMol Glycin sowie Arginin zu der gewünschten Molarität wurden zum Inkubationsansatz gegeben. Nach 6 h Inkubation bei 27°C auf der rotierenden Schüttelmaschine wurde nach Abfiltrieren des Mycels das Kulturfiltrat mit 5 ml einer 1 %igen $FeCl_3$-Lösung versetzt. Die Sideramine wurden über Amberlite XAD-2 (II.5.2.3.) isoliert. Der Sideraminrohextrakt, der nur geringe Mengen an ^{14}C-Glutaminsäureverunreinigungen enthielt, wurde auf DC-Alufolien Kieselgel 60 im Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser (65/25/4) aufgetrennt. Die Radioaktivität der Ferricrocinbande wurde nach Auskratzen des Kieselgels aus der Platte im LSC bestimmt. Der Einbau von ^{14}C-Glutaminsäure in Desferri-Ferricrocin bei verschiedenen Argininkonzentrationen ist in Abb. 31 dargestellt.

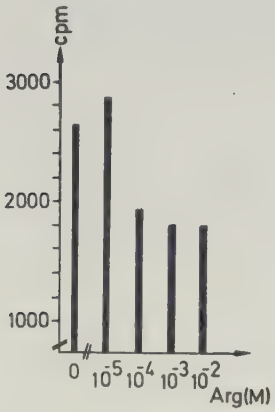


Abb. 31:

Einbau von ^{14}C-Glycin in Desferri-Ferricrocin in vivo (in Gegenwart verschiedener Argininkonzentrationen) nach 12 h.

Schüttelkolbenversuch (N-Kolben): Inkubation des Mycels 12 h lang in 0,1 %iger Glucoselösung (1 µCi ^{14}C-Glutaminsäure (0,1 µMol), 1 µMol Serin, 1 µMol Glycin sowie Arginin (10^{-5} - 10^{-2} M))

Abb. 32 zeigt den prozentualen Einbau von ^{14}C-Glutaminsäure in Desferri-Ferricrocin nach 6 bzw. 12 h auf dem obigen Medium bei verschiedenen Argininkonzentrationen.

Arginin hemmt deutlich den Einbau von ^{14}C-Glutaminsäure in Desferri-Ferricrocin bei Konzentrationen >10^{-5} M.

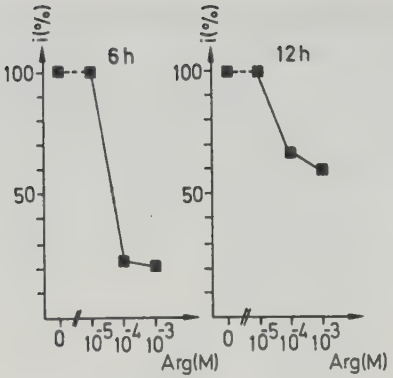


Abb. 32: Prozentualer Einbau von ^{14}C-Glutaminsäure in Desferri-Ferricrocin in Gegenwart verschiedener Argininkonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle ohne Arginin.

Schüttelkolbenversuch (N-Kolben): Inkubation des Mycels 6 bzw. 12 h in 0,1 %iger Glucoselösung (1 µCi ^{14}C-Glutaminsäure (0,1 µMol), 1 µMol Serin, 1 µMol Glycin sowie Arginin (10^{-5} - 10^{-3} M)).

Die Untersuchungen zur Biosynthese des δ-N-Hydroxy-L-ornithins sprechen in ihrer Gesamtheit für eine direkte Hydroxylierung des Ornithins, was später ausführlich diskutiert wird.

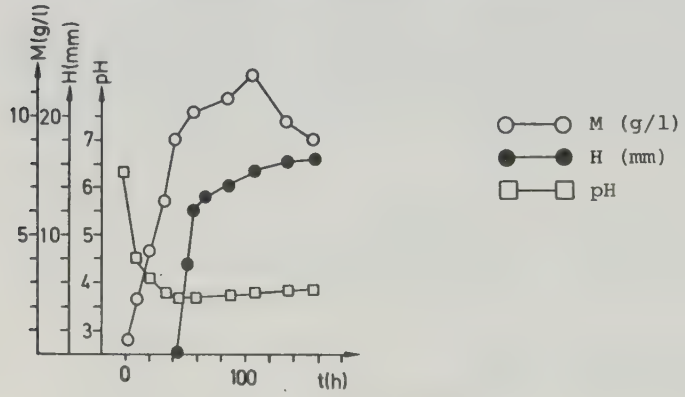
D. ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES ANTIBIOTIKUMS AUS DEM KULTURFILTRAT VON ASPERGILLUS VIRIDI-NUTANS

Für eine Sideraminfermentation in größerem Maßstab ist es wichtig, antibiotische Aktivitäten, die vom Sideraminproduzenten unter den Sideraminfermentationsbedingungen gebildet werden, näher zu kennen.

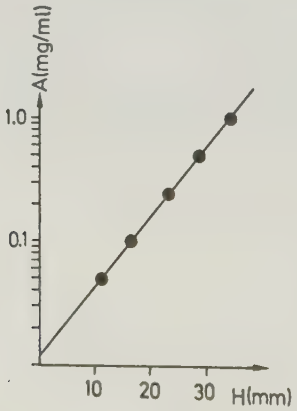
Bei Feed-Batch-Kulturen des Pilzes auf einem variierten Normalmedium konnte nur vereinzelt eine minimale Aktivität gegen Saprolegnia asterophora bzw. Bacillus subtilis im Kulturfiltrat festgestellt werden. Die antibiotische Aktivität war aber meist nicht stabil und trat während der Fermentation nur sporadisch auf.
Auf Nährmedien mit einem wesentlich größeren C/N-Verhältnis als bei der Sideraminfermentation üblich, d.h. C/N $\gg$ 8/1 wie z.B. bei dem Raulin-Thom-Medium (RAISTRICK und RUDMAN, 1956), zeigte der Pilz deutliche antibiotische Aktivitäten gegen Saprolegnia asterophora bzw. Bacillus subtilis. Die Fermentation erfolgte in 10 l-Fermentern; als Inoculum dienten 10 % einer 4 Tage alten Schüttelkolbenkultur auf dem Raulin-Thom-Medium. Der Fermentationsverlauf ist in Abb. 33 dargestellt.

Bei Abbruch der Fermentation lagen im Kulturfiltrat etwa 90 mg Antibiotikum/l vor.
Die Isolierung erfolgte nach dem Aufarbeitungsschema (II.15.1.) unter rein qualitativen Gesichtspunkten, um möglichst rasch abzuklären, ob es sich bei der antibiotischen Aktivität um die cancerogene Substanz "Viriditoxin" handelt (LILLEHOJ und CIEGLER, 1972), die von Aspergillus viridi-nutans gebildet wird. Auf eine quantitative Aufarbeitung wurde mit dem Risiko, Nebenkomponenten zu verlieren, bewußt verzichtet.
Die Ausbeuten an Antibiotikum lagen bei 1-5 %.
Das Präparat war zu über 95 % rein, wie HPLC-Untersuchungen zeigten. Der Rf-Wert des Antibiotikums auf DC-Alufolien Kieselgel 60 F_{254} im Laufmittel Chloroform/Acetonitril/Ameisen-

Abb. 33: Antibiotikumproduktion bei Aspergillus viridinutans auf dem Raulin-Thom-Medium im 10 l-Fermenter



a) Wachstum, pH-Verlauf und antibiotische Aktivität (Hemmhofdurchmesser) gegen Bacillus subtilis



b) Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers (mm) von der Antibiotikumkonzentration (mg/ml) im Agar-Diffusionstest (Medium 130) bei Bacillus subtilis

säure (97/15/1,5) betrug 0,42 (Viriditoxin 0,48); in Chloroform/Methanol (9/1) war der Rf-Wert 0,58 (0,64 für Viriditoxin). Das lyophilisierte Antibiotikum ist farblos bis schwach gelblich; Viriditoxin dagegen ist gelbgrün. In Abb. 34 sind das UV-Spektrum und das IR-Spektrum des isolierten Antibiotikums aufgezeigt.

Das Wirkungsspektrum der antibiotischen Substanz ist in Tabelle 12 aufgezeigt.

Tabelle 12: Antibiotische Aktivität der Substanz aus Aspergillus viridi-nutans gegen verschiedene Organismen im Plattendiffusionstest (Hemmhofdurchmesser in mm)

Testorganismus	Medium	Antibiotikumkonzentration 1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,01 mg/ml
Escherichia coli	130	14 mm	-	-
Bacillus subtilis	130	32 mm	18 mm	-
Saprolegnia asterophora	CA	29 mm	13 mm	-
Nematospora coryli	HA	22 mm	8 mm	-

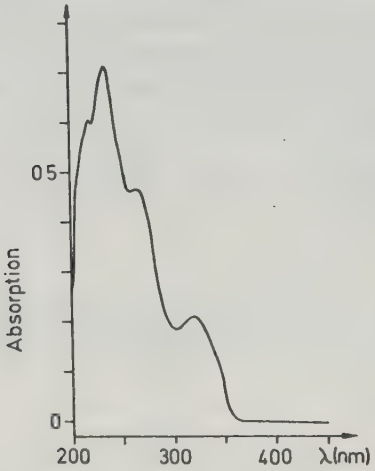
10 µl Testlösung/Filterrondell

Die minimale Hemmkonzentration des Antibiotikums im Verdünnungsreihentest gegen Bacillus subtilis (auf Medium 130) betrug 30 µg/ml.

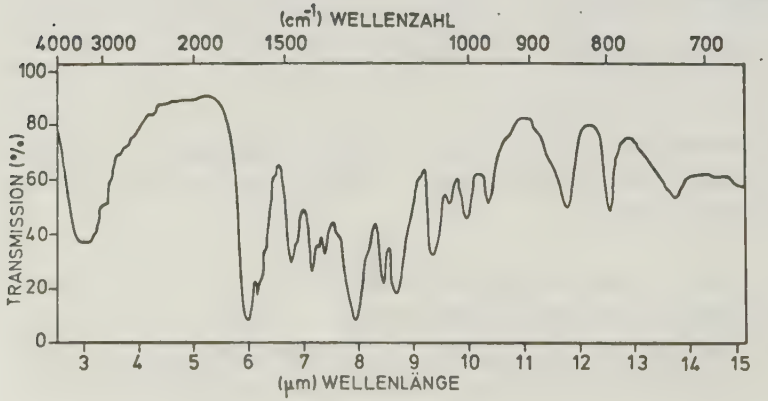
Die Struktur des Antibiotikums wurde von Prof. Dr. W.A. König (Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Hamburg) aufgeklärt. Das Antibiotikum besitzt das Molekulargewicht 234; die Summenformel lautet $C_{12}H_{10}O_5$.

Leider erwies sich die Substanz identisch mit 4-Acetyl-6,8-dihydroxy-5-methyl-2-benzopyranon-1,das von ALDRIDGE et al. (1966) bei Aspergillus viridi-nutans als antifungischer Metabolit beschrieben wurde.

Abb. 34: Spektroskopische Charakterisierung des Antibiotikums



a) UV-Spektrum
(0,01 mg Antibiotikum/ml Methanol; Leerwert: Methanol)



b) IR-Spektrum

Viriditoxin wurde mir freundlicherweise von Prof. Dr. E.B. Lillehoj, Northern Regional Research Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, zur Verfügung gestellt.

IV. DISKUSSION

A. OPTIMIERUNG DER DESFERRI-FERRICROCINPRODUKTION BEI ASPERGILLUS VIRIDI-NUTANS

Nur bei den wenigsten Fermentationsverfahren sind die optimalen Wachstumsbedingungen identisch mit den optimalen Produktionsbedingungen der gewünschten Substanz. Auf jeder Stufe der Fermentationsprozesse (scale-up) müssen die optimalen Produktionsparameter festgelegt werden (AIBA et al., 1973).

Aus einer Verdopplung der Glucosekonzentration des Normalmediums resultierte in Schüttelkolbenversuchen bei Aspergillus viridi-nutans eine fast verdoppelte Sideraminausbeute; im 20 l-Fermenter dagegen zeigte der Pilz bei äußerst raschem Wachstum nur eine sehr mäßige Sideraminbildungsgeschwindigkeit; die Sideraminausbeute sank auf ein Drittel ab (unveröffentlichte Ergebnisse). Unter den Fermentationsbedingungen im 20 l-Fermenter mit Umwurfsystem ("intensor system") besteht bei Aspergillus viridi-nutans eine negative Korrelation zwischen Wachstumsgeschwindigkeit des Organismus und Sideraminbildungsgeschwindigkeit. Optimierungsversuche der Sideraminproduktion im Schüttelkolbenmaßstab können somit nur Anhaltspunkte für eine Verbesserung der Fermentationsprozesse im 20 l-Maßstab geben.
Im 20 l-Fermenter mit Umwurfsystem wächst der Pilz mit einem äußerst feinen filamentösen Mycel. In Kolben mit 4 Schikanen zeigt Aspergillus viridi-nutans ebenfalls filamentöses Wachstum, aber die Hyphenstränge hängen oft zu größeren dichten Klumpen - sogenannten Mycelfladen - zusammen; in Normalkolben ohne Schikane wächst der Pilz auf dem einfachen Normalmedium in Form kleiner Pellets. Sauerstoff- sowie Nährstoffaufnahme pro Zellmasse sind bei solch unterschiedlichen Wachstumsformen sehr verschieden (TSAO und LEE, 1977).

Feedingverfahren zur Desferri-Ferricrocinproduktion bei Aspergillus viridi-nutans - Zufütterung von Nährstoffen a) abhängig vom pH-Wert bzw. b) vom Sauerstoffpartialdruck in der Submerskultur - ermöglichen hohe Sideraminausbeuten (Abb. 6, 7, 8).

Feedingverfahren zur Gewährleistung spezieller Produktionsbedingungen gewinnen in der Praxis immer größere Bedeutung, z.B. zur Umgehung einer Katabolitrepression (Penicillinproduktion: DEMAIN, 1972 a; PAN et al., 1972; PIRT, 1974; Produktion von extrazellulärer β-Amylase: YAMANÉ und TSUKANO, 1977; Backhefeherstellung: AIBA et al., 1976) oder bei Nährstoffen, die in höheren Konzentrationen für den Organismus toxisch sind (methanolverwertende Bakterien: NISHIO et al., 1977).

In der Feedinglösung wurde Essigsäure als C-Quelle verwendet, da in Schüttelkolbenversuchen durch Acetatzusatz zum Normalmedium die Sideraminausbeuten signifikant gesteigert werden konnten (Tabelle 1); im 20 l-Fermenter konnte bei Acetatzusatz zum Nährmedium die Sideraminproduktionsgeschwindigkeit zwar nur geringfügig erhöht, dafür aber die Fermentationszeit wesentlich verlängert werden. Ein Zusatz von Glucose (8 %, w/v) zu 50 %iger Essigsäure in der Feedinglösung verschlechterte etwas die Sideraminausbeuten (unveröffentlichte Ergebnisse).

Bei Aspergillus nidulans konnten bei Wachstum auf Acetat deutlich erhöhte Aktivitäten der Enzyme des Tricarbonsäurecyclus im Vergleich zu Glucose als Hauptkohlenstoffquelle festgestellt werden (McCULLOUGH et al., 1977). Möglicherweise liegt bei Anwesenheit von 8 % Glucose in der Feedinglösung eine etwas veränderte Aktivität der Citronensäurecyclusenzyme bei Aspergillus viridi-nutans vor, welche diesen "Glucose-Feeding-Effekt" erklären würde. Eine unterschiedliche Aktivität der Malatdehydrogenase (MDH) konnte bei Aspergillus viridi-nutans bei Wachstum auf einem variierten Normalmedium mit Glucose (8 g C/l) bzw. Glucose/Acetat (jeweils 4 g C/l), Harnstoff (1 g N/l) sowie 1 g Hefeextrakt/l festgestellt werden. Auf dem "Glucose-Acetat-Me-

dium" zeigte der Pilz eine doppelt so große MDH-Aktivität als auf dem entsprechenden Medium mit Glucose als einziger C-Quelle (unveröffentlichte Ergebnisse).
Ein Ersatz der Glucose als Hauptkohlenstoffquelle im Nährmedium durch Stärke ist möglich. Durch Zusatz von Hefeextrakt zum "Stärkemedium" wurde die Wachstumsgeschwindigkeit von Aspergillus viridi-nutans auf Stärke etwas beschleunigt. Der Pilz wächst auf Stärke sehr langsam (Tabelle 2). Unterhalb einer kritischen Wachstumsgeschwindigkeit besteht die negative Korrelation zwischen Sideraminbildungsgeschwindigkeit und Wachstumsgeschwindigkeit nicht mehr: bei allzu schlechtem Wachstum zeigt der Pilz eine schlechte Sideraminproduktion.
Eine Fermentation mit verbesserter Belüftung (0,7 vvm) auf dem "Stärke-Medium" erbrachte nur eine geringfügige Verbesserung der Sideraminbildungsgeschwindigkeit bei einer sehr hohen Myceldichte (Abb. 7) im Vergleich zu einer Belüftung mit 0,5 vvm (unveröffentlichte Ergebnisse).
Ein C/N-Verhältnis von 18/1 in der Feedinglösung erwies sich als günstiger als C/N = 8/1, da ein starker Anstieg der Stickstoffkonzentration, wie er in Abb. 6 zu beobachten ist, vermieden wird.
Gut zur Kontrolle des physiologischen Zustandes der Kultur im Fermenter eignet sich die Abluftanalyse (Abb. 7 c) (FIECHTER und VON MEYENBURG, 1968). Ein plötzliches "Umkippen" der Kultur bei Feeding-Versuchen, d.h. ein Absterben von Organismen, kann frühzeitig am Verlauf der Sauerstoff- bzw. Kohlendioxidkurve erkannt werden, so daß unter Umständen die Fermentation durch eine kurzfristige erhöhte Zugabe von Nährstoffen "gerettet" werden kann.
Ein Feeding abhängig vom pH-Wert erwies sich als sehr störungsunanfällig - im Gegensatz zu Feeding-Versuchen in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck in der Submerskultur. Ein Zuwachsen der Sauerstoffelektrodenmembran kann zwar durch eine Reinigungsvorrichtung vermieden werden (HASENBÖHLER, 1978), aber die Ausfallquote der Sauerstoffelektroden bei längeren Fermentationen ist oft hoch, so daß ein

Feeding abhängig vom Sauerstoffpartialdruck zur Desferri-Ferricrocinproduktion unter ökonomischen Gesichtspunkten nicht zu verantworten wäre. Eine weitere Störgröße ist die Veränderung des Gashaushalts bei Schäumen der Kultur und Antischaumzugabe (YAGI und YOSHIDA, 1974).

Eine massenspektroskopische Erfassung des Sauerstoffs in der Submerskultur (REUSS et al., 1976) sowie flüchtiger Nährmediumbestandteile und Stoffwechselprodukte wird in Zukunft sicherlich die Möglichkeiten der Zufütterung von Substanzen in Abhängigkeit von "internen" Parametern - besonders im Hinblick auf computergesteuerte Fermentationsprozesse - wesentlich erweitern.

Desferri-Ferricrocin enthält 3 Moleküle δ-N-Acetyl-δ-N-hydroxy-L-ornithin sowie 2 Moleküle Glycin und 1 Molekül Serin.
Bei Pilzen existieren für Serin 2 Biosynthesewege (PATEMAN und KINGHORN, 1976):

a) Nicht-phosphorolytischer Weg: D-Glycerat → Hydroxypyruvat → Serin
b) Phosphorolytischer Weg: 3-Phosphoglycerat → Phosphohydroxypyruvat → Phosphoserin → Serin.

Die verschiedenen Aktivitäten der beiden Wege können durch die Art der Kohlenhydratquelle reguliert werden (SOJKA und GARNER, 1967). Serin wird durch die Hydroxymethyltransferase in Glycin überführt. Bei Aspergillus niger konnte ein alternativer Stoffwechselweg zur Glycinbiosynthese nachgewiesen werden: Glyoxylat wird in einer Transaminasereaktion mit L-Alanin in Glycin überführt (GALBRAITH und SMITH, 1969).
Serin wird über O-Acetylserin in L-Cystein überführt (PATEMAN und KINGHORN, 1976). Ob z.B. durch eine Mutation der O-Acetylserintransacetylase (PIENIAZEK et al., 1974) die Sideraminbiosynthese positiv beeinflußt werden kann, müssen nähere Untersuchungen des Serin- und Glycinbiosyntheseweges bei Aspergillus viridi-nutans unter den Sideraminfermenta-

tionsbedingungen zeigen.
δ-N-Acetyl-δ-N-hydroxy-L-ornithin entsteht höchstwahrscheinlich durch Hydroxylierung der δ-Aminogruppe von Ornithin mit anschließender Acetylierung (s. IV.C).
Für eine ausreichende Ornithinbiosynthese ist ein aktiver Citronensäurecyclus Voraussetzung, damit genügend α-Ketoglutarat zur Glutaminsäure- und somit zur Ornithinbiosynthese zur Verfügung steht. Da Aspergillus viridi-nutans bei Feedingexperimenten mit Essigsäure als einziger C-Quelle in der Feedinglösung sehr gute Sideraminbildungsgeschwindigkeiten zeigte, muß der Pilz neben einem Glyoxylat-Shunt auch ausgeprägte anaplerotische Sequenzen zur Bereitstellung von C_3-Körpern - ausgehend von Substanzen des Citronensäurecyclus - zur Serin- und damit auch zur Glycinbiosynthese besitzen (McCULLOUGH et al., 1977; COCHRANE, 1976).

Bei allen durchgeführten Fermentationen stellte die Sideraminbildungsgeschwindigkeit von 20 mg/l·h eine kritische obere Grenze dar. Durch Ausschaltung von Regulationseffekten im Aminosäurestoffwechsel (z.B. Arginin-Feedback-Mechanismus, s. III.C) oder durch Verlustmutanten einzelner Enzyme nach Verzweigungsstellen im Stoffwechsel, die von der Biosynthese der Sideraminbausteine wegführen, könnte die Sideraminbiosynthese sicherlich noch wesentlich gesteigert werden. Vorteilhaft wäre z.B. eine Mutante in der α-Ketoglutaratdehydrogenase oder wären auch nur aminosäureauxotrophe Mutanten (z.B. für Lysin), um durch die Zufütterungsrate der entsprechenden auxotrophen Aminosäure das Wachstum des Organismus auf Nährmedien, die dem Wildstamm ein sehr rasches Wachstum ermöglichen (z.B. hohe Glutaminsäure- und Glycinkonzentrationen), zu regulieren.
Aminosäureauxotrophe Mutanten vom Desferri-Ferricrocinproduzenten Aspergillus viridi-nutans wurden durch Bestrahlen der Sporen mit nahem UV nach Vorinkubation der Sporen in einer 8-Methoxypsoralenlösung (8-MOP) erhalten. Die Vorbehandlung der Sporen mit 8-MOP vergrößert den mutagenen Effekt von UV (ALDERSON und SCOTT, 1970; SCOTT und ALDERSON, 1971).

Die "auxotrophen" Mutanten (Arg^-, Lys^-, Thr^-) erwiesen sich aber im 20 l-Fermenter bei längerer Fermentation auf Nährmedien, die dem Wildstamm ein äußerst rasches Wachstum ermöglichen, als nicht stabil; die auxotrophen Klone wurden nach einiger Zeit von Revertanten überwachsen (unveröffentlichte Ergebnisse).
Dieses Problem der ungenügenden genetischen Stabilität der auxotrophen Mutanten könnte sicherlich durch eine gezielte genetische Bearbeitung von Aspergillus viridi-nutans gelöst werden (COVE, 1977).

B. REGULATION DER SIDERAMINBIOSYNTHESE DURCH EISEN

Eisen unterdrückt bei Aspergillus viridi-nutans die Desferri-Ferricrocinproduktion in Konzentrationen $>10^{-5}$ M (Abb. 9).
Bei Ustilago sphaerogena beeinflußt Eisen die Biosynthese von Desferri-Ferrichrom und Desferri-Ferrichrom A bereits bei Konzentrationen $>5 \cdot 10^{-7}$ M (EMERY, 1971 b).
Eisen reguliert z.B. die Biosynthese von Hydroxamaten der Ferrioxaminreihe (ZÄHNER et al., 1962), der Fusarininreihe (EMERY, 1965) und der Mycobactine (SNOW, 1970) in anderen Organismen.
Da die biologische Funktion der Hydroxamate eine Chelatisierung von Eisen und Transport in die Zelle ist, erscheint eine Regulation der Sideraminbiosynthese für den Produzenten ökonomisch, wenn man bedenkt, daß der Desferri-Ferricrocinproduzent Aspergillus viridi-nutans unter Eisenmangelbedingungen in Extremfällen weit mehr als 20 % der Biomasse an Sideramin produziert (Abb. 6, 7).
Der Mechanismus der Eisenregulation der Sideraminbiosynthese ist noch unaufgeklärt.
Eisen beeinflußt den Zellstoffwechsel auf vielen Ebenen; die elementare Frage war somit, ob eine d i r e k t e Regulation der Sideraminbildung durch Repression, Feed-

back-Mechanismen oder sonstige Hemmechanismen vorliegt oder die Sideraminproduktion i n d i r e k t über verschiedene Stoffwechselaktivitäten bei unterschiedlicher Eisenversorgung reguliert wird.
Bei Aspergillus viridi-nutans wurde etwa 5 h nach Eisenzugabe (10^{-4} M) die Desferri-Ferricrocinproduktion eingestellt (Abb. 10). Das angebotene Ferricrocin wurde nur zu einem geringen Teil von den Zellen aufgenommen.
Eisenaufnahmestudien bei den Pilzen Ustilago sphaerogena (EMERY, 1971 a) und Neurospora crassa (WINKELMANN und ZÄHNER, 1973) beweisen die Existenz eines spezifischen Aufnahmesystems von Sideramin-Fe-Komplexen. Der Sideramintransport ist ein aktiver Prozeß; die Desferriverbindung wird nicht in die Zelle aufgenommen (EMERY, 1971 a).
Bei Bakterien wurden Siderochrom-Bindeproteine in der äußeren Membran beschrieben (HANTKE und BRAUM, 1975 a; WAYNE und NEILANDS, 1975).
Spezifische Bindeproteine zur Sideraminaufnahme gibt es sicherlich auch bei Pilzen, wie die spezifische Sideraminaufnahme bei verschiedenen Organismen beweist (WIEBE und WINKELMANN, 1975; EMERY, 1971 a; WINKELMANN, 1974; LEONG et al., 1974). In der Cytoplasmamembran von Neurospora crassa konnten spezifische Sideraminbindeproteine nachgewiesen werden (ERNST, 1976; ERNST und WINKELMANN, 1977 a).

Ein großer Eisenbedarf herrscht in der Atmungskette (z.B. Cytochrome (YAMANAKA und OKUNUKI, 1974), Nicht-Häm-Eisenproteine (BRAGG, 1974)). Eine indirekte Regulation der Sideraminbiosynthese abhängig von verschiedenen "Stoffwechselgleichgewichten" bei Eisenangebot und "Eisenmangel" - z.B. durch das Verhältnis von NAD/NADH - wäre denkbar.
Bei Eisenmangel produzieren zahlreiche Mikroorganismen vermehrt Riboflavin (DEMAIN, 1972 b); Ferredoxine (Eisen-Schwefel-Proteine) werden bei Eisenmangel oft durch Flavodoxine (Flavoproteine) ersetzt (MAYHEW und LUDWIG, 1975).

Bei 10^{-6} bzw. 10^{-4} M Fe(III) konnten unter den Schüttelkolbenbedingungen nur geringe Unterschiede in der Atmungsakti-

vität bei Aspergillus viridi-nutans festgestellt werden (Tabelle 6). Es wäre interessant, bei Aspergillus viridi-nutans die Zusammensetzung der Atmungskette bei unterschiedlichem Eisenangebot näher zu erforschen.
Während sich im Schüttelkolben bei unterschiedlichem Eisenangebot deutliche Wachstumsunterschiede bemerkbar machten, zeigte der Pilz unter den Sideraminfermentationsbedingungen im 20 l-Fermenter keine Unterschiede im Wachstum und im Abbau der Nährstoffe (Abb. 11).
Eine Beeinflussung der Sideraminbiosynthese bei unterschiedlichem Eisenangebot durch bestimmte Stoffwechselaktivitäten ist zwar nicht auszuschließen, aber die Hauptregulation erfolgt sicherlich nicht indirekt über verschiedene "Stoffwechselgleichgewichte" bei Eisenangebot und "Eisenmangel", da keine irreversible Hemmung der Sideraminbiosynthese nach Eisengaben vorliegt. In der Sideraminbiosynthese gehemmtes Mycel - d.h. Mycel mit ausreichender Eisenversorgung - zeigte nach Übertragung auf neues eisenfreies Nährmedium wieder eine beachtliche Sideraminproduktion (Abb. 12, 13). Auch läßt die recht hohe kritische Eisenkonzentration $>10^{-5}$ M zur Einstellung der Desferri-Ferricrocinbildung bei Aspergillus viridi-nutans eine indirekte Regulation der Sideraminproduktion durch Eisen als unwahrscheinlich erscheinen.

Bei Zugabe von ^{55}Fe-Ferricrocin zu eisenfreien Aspergillus viridi-nutans-Kulturen lag das ins Mycel aufgenommene Eisen "vollständig"als ^{55}Fe-Ferricrocin vor (Abb. 14, 15); eine Proteinfraktion, die spezifisch Eisen bindet und eventuell regulatorisch wirksam sein könnte, wurde nicht gefunden.

Zur Untersuchung einer direkten regulatorischen Funktion von Ferricrocin wurden Studien zur Hemmung der Desferri-Ferricrocinbildung mit metallanalogen Desferri-Ferricrocinen durchgeführt. Bei Ustilago sphaerogena fand EMERY (1971 a) eine gute Aufnahme von ^{14}C-Desferri-Ferrichrom in Gegenwart von Fe(III), Al(III), Ga(III) sowie zu einem geringen Pro-

zentsatz von Tl(III).
Alumichrom ist in seiner Konformation Ferrichrom sehr ähnlich (LLINAS et al., 1970). Alumichrom beeinflußt bei Ustilago sphaerogena nicht die Desferri-Ferrichromproduktion, obwohl es in die Zellen eingeschleust und dort angereichert wird (Al(III) kann nicht wie Fe(III) durch Reduktion aus dem Sideraminkomplex befreit werden).Eine Spaltung des Ferrichrommoleküls durch eine Peptidase konnte bei Ustilago sphaerogena ausgeschlossen werden, da ^{14}C-Ferrichrom kurze Zeit nach Aufnahme ins Mycel als Desferriverbindung wieder ausgeschieden wurde (EMERY, 1971 a).
EMERY (1976) konnte bei Fusarium roseum und Penicillium sp. eine Ornithinesterase (Spaltung von Sideraminen des Estertyps in monomere Untereinheiten, z.B. Fusigen in Fusarinin) analog der Enterochelinesterase bei E. coli (O'BRIEN et al., 1971; PORRA et al., 1972) nachweisen.
Bei Neurospora crassa wird die Desferri-Coprogenbiosynthese nach WINKELMANN et al., (1973) durch Zusatz von Fe(III), Ga(III), Al(III), V(III) zum Kulturmedium unterdrückt. Eine angelaufene Desferri-Coprogenbildung wird innerhalb 24 h mit Coprogen (10 µM), Ga(III)-Desferri-Coprogen (10 µM) bzw. Al(III)-Desferri-Coprogen (>100 µM) reprimiert.
Eine Beeinflussung der Desferri-Ferricrocinbiosynthese bei Aspergillus viridi-nutans durch Al(III), Ga(III), V(III) konnte jedoch weder bei Zusatz der Metalle zum Nährmedium noch bei einer Zugabe der Metall(III)-Sideraminkomplexe zu 4 Tage alten Kulturen (Tabelle 8, Abb. 16) festgestellt werden. Bei 10^{-3} M Aluminium war im Kulturmedium kein Sideramin mehr zu finden (Abb. 17); die "fehlende" Sideraminausscheidung des Organismus beruhte aber nicht auf einer Hemmung der Desferri-Ferricrocinproduktion durch Alumicrocin, sondern auf einem sofortigen Transport des ausgeschiedenen Desferri-Ferricrocins als Alumicrocin in die Zelle (Abb. 18). Nach vollständiger Aufnahme des Al(III) im Kulturmedium als Alumicrocin ins Mycel entsprach die Sideraminausscheidungsgeschwindigkeit wieder dem Kontrollwert (Abb. 19).
Bei Anzucht von Aspergillus viridi-nutans bei 10^{-4} M Fe(III)

waren im orangerot gefärbten Mycel keine nachweisbaren Mengen Ferricrocin vorhanden (Abb. 18). Es wäre interessant, den orangeroten "Farbstoff" - bei dem es sich höchstwahrscheinlich um einen Eisenkomplex, möglicherweise um eine Eisenspeicherform analog dem Ferritin (DAVID, 1974) handelt - zu isolieren und näher zu charakterisieren.
Eine Regulation der Sideraminbiosynthese durch die Chelatkonformation, wie sie von WINKELMANN et al., (1973) bei dem Desferri-Coprogen-Produzenten Neurospora crassa diskutiert wird, trifft für die Regulation der Desferri-Ferricrocinproduktion bei Aspergillus viridi-nutans in keiner Weise zu. Bei den Pilzen scheint es somit kein allgemein gültiges Regulationsprinzip der Sideraminbiosynthese durch Eisen zu geben.

Die Ferricrocinaufnahme bei Aspergillus viridi-nutans unterliegt im Gegensatz zur Alumicrocinaufnahme einem Regulationsmechanismus (Abb. 20); es wird stets nur ein geringer Teil des angebotenen Ferricrocins vom Mycel aufgenommen. Zur Regulation des Aufnahmesystems ist eine Freisetzung von Eisen aus dem Sideramin eine notwendige Voraussetzung.

Zur Untersuchung einer eventuellen Induktion eines Repressorproteins der Sideraminbiosynthese durch Eisen wurden Versuche unternommen, die Sideraminbiosynthesehemmung durch Eisen durch verschieden lange Vorinkubation (0-6 h) des Mycels mit Hemmstoffen der Proteinsynthese vor Zugabe von Ferricrocin aufzuheben. Bei Konzentrationen von Cycloheximid bis 500 µg/ml bzw. Puromycin bis 50 µg/ml konnte keine Beeinflussung der Eisenhemmung der Sideraminbiosynthese bei Aspergillus viridi-nutans festgestellt werden (unveröffentlichte Ergebnisse).

Bei Aspergillus viridi-nutans ist bei Eisenangebot eine Hexapeptidsynthetaseaktivität in vitro stets nachweisbar (Tabelle 11), auch wenn das Mycel keine nachweisbaren Mengen

Ferricrocin enthält (Abb. 18). Diese Befunde stehen im Gegensatz zu näher untersuchten Enzymen der Sideraminbiosynthese bei Eisenangebot bei anderen Organismen, z.B. Rhodotorulasäuresynthetase (ANKE und DIEKMANN, 1972; ANKE, 1973) oder der Fusigensynthetase (ANKE et al., 1973). Ferricrocin bewirkte im in-vitro-System zur Hexapeptidsynthese bei Aspergillus viridi-nutans keine Aktivitätsänderung des Enzyms (Tabelle 8). Eine N-Hydroxylierung fand unter den gewählten Inkubationsbedingungen nicht statt, da kein ^{14}C-Ornithin in Desferri-Ferricrocin inkorporiert wurde. Der Enzymkomplex zur Hexapeptidsynthese wurde bei Aspergillus viridi-nutans in vitro äußerst leicht durch Proteasen (COHEN, 1977) inaktiviert. Interessant ist, daß die strenge Desferri-Ferricrocinspezifität der Hexapeptidsynthetase in vivo unter in-vitro-Bedingungen aufgehoben ist; während Aspergillus viridi-nutans in vivo nur verschwindend kleine Mengen Desferri-Ferrichrom neben dem Hauptprodukt Desferri-Ferricrocin produziert, kann bei der Hexapeptidsynthese in vitro leicht Serin durch Glycin ersetzt werden, wie die deutliche Ferrichrombildung zeigt (Abb. 22).

In vitro konnte bei Aspergillus viridi-nutans eine Ferricrocin-Reduktase nachgewiesen werden (Tabelle 11, Abb. 24). Auch in Mycel, dessen Sideraminbiosynthese durch Eisen gehemmt war, konnte im Gegensatz zu Befunden von ERNST und WINKELMANN (1977 b) bei Neurospora crassa eine deutliche Reduktaseaktivität nachgewiesen werden. Coenzym der Reduktase ist NADH. Der systematische Name ist NADH:Ferricrocin-Oxidoreduktase.

Die Enzyme der Sideraminbiosynthese sowie die NADH:Ferricrocin-Oxidoreduktase scheinen bei Aspergillus viridi-nutans dem gleichen Regulationsprinzip zu unterliegen; möglicherweise erfolgt die Regulation der Enzymaktivität durch Fe(II).

Nicht im Widerspruch zu einer direkten Eisenregulation der

Sideraminbiosynthese steht der Zeitraum von 4-6 h, der zu einer vollständigen Hemmung der Sideraminproduktion notwendig ist (Abb. 10), da nach Ferricrocinaufnahme ins Mycel zunächst das freigesetzte Eisen für Stoffwechselprozesse abgezogen wird, ehe es zu einer potentiellen Anreicherung von Eisen kommt, das regulatorisch wirksam sein könnte.

Der Ort der Sideraminbiosynthese in der Zelle (Hexapeptidsynthetasetest als Leitkriterium) sowie die einzelnen Biosyntheseschritte zu Desferri-Ferricrocin müssen in fortführenden Arbeiten durch Isolierung und Reinigung der Enzyme bzw. des Enzymsystems der Sideraminbiosynthese näher erforscht werden.
Erst durch in-vitro-Versuche an gereinigten oder wenigstens angereicherten Enzymfraktionen kann dann endgültige Klarheit über die Regulation der Sideraminbiosynthese durch Eisen gewonnen werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse zur Regulation der Desferri-Ferricrocinbiosynthese bei Aspergillus viridi-nutans durch Eisen geben Anhaltspunkte für eine weitere Verbesserung der Desferri-Ferricrocinproduktion durch Mutanten. Eine Mutante mit vollständiger am Wirkort, d.h. an der "Sideraminsynthetase", aufgehobener Eisenhemmung scheint es bei Aspergillus viridi-nutans nicht zu geben. Jedoch könnte bei Aspergillus viridi-nutans die Eisenhemmung der Sideraminbiosynthese bei Eisenkonzentrationen, wie sie bei natürlichen ungereinigten Nährmedien zu erwarten sind, indirekt durch eine Mutation im spezifischen Ferricrocinaufnahmesystem aufgehoben werden.
Eine Eisenaufnahme durch organische Säuren, die bei Eisenmangel in erhöhter Konzentration ins Kulturmedium ausgeschieden werden, kann durch Zugabe von etwas Desferri-Ferricrocin zum Nährmedium a priori reguliert werden, da die organischen Säuren Fe(III) im Ferricrocin unter den Sideraminfermentationsbedingungen nicht mobilisieren können.

Die Verwendung einer derartigen Mutante zur Desferri-Ferricrocinproduktion würde zu einer wesentlichen Senkung der Nährmediumkosten führen, da der Eisengehalt der Nährmediumkomponenten keine Rolle mehr spielt. Auch ist durch eine derartige Mutante im Ferricrocinaufnahmesystem die Gefahr gebannt, daß die Sideraminbildung durch Eisenverunreinigungen, die im Verlauf der Fermentation in den Fermenter gelangen - z.B. aus Zuleitungsrohren bei pH-statischer Fermentation - gestoppt wird und es somit zu kostspieligen Produktionsausfällen kommt.

C. BIOSYNTHESE VON δ-N-HYDROXY-L-ORNITHIN

Hydroxamsäuren besitzen eine sehr weite Verbreitung in der Natur (NEILANDS, 1973). Hadacidin (N-Formyl-N-hydroxyglycin), die am einfachsten gebaute Hydroxamsäure, wird von mehreren Penicillium-Species gebildet (DULANEY und CRAY, 1962; KACZKA et al., 1962). Hadacidin ist zwar ein untypischer Vertreter der natürlich vorkommenden Hydroxamsäuren, da seine Biosynthese keiner Eisenregulation unterliegt (DULANEY, 1963) und Hadacidin keine Rolle im mikrobiellen Eisenstoffwechsel spielt (Hadacidin hemmt die Adenylosuccinatsynthetase (SHIGUERA und GORDON, 1962) und besitzt somit eine Antitumorwirkung), aber die N-Hydroxylierung wurde sehr gut von STEVENS und EMERY (1966) untersucht. Die Aminogruppe von Glycin wird in einer Oxygenasereaktion durch molekularen Sauerstoff hydroxyliert. Die Amidgruppe von N-Formylglycin wird nicht hydroxyliert. Durch Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes bei Fermentationen mit Penicillium aurantio-violaceum konnte die Hadacidinbiosynthese signifikant gesteigert werden.

Bei der Biosynthese der N-Hydroxy-Gruppe von Sideraminen der Ferrichromreihe sind prinzipiell folgende Möglichkeiten zu beachten:

1. Bildung der δ-N-Hydroxygruppe ausgehend von Glutaminsäure-ɣ-semi-aldehyd, z.B.
   a) 2-Elektronen-Reduktion eines Oxims nach Kondensation von Hydroxylamin an eine Ketogruppe
   b) Bildung eines Imins und anschließende Hydratation der Iminogruppe
2. direkte Hydroxylierung der δ-Aminogruppe von Ornithin
3. Hydroxylierung einer Amidbindung (δ-N-Acyl-Ornithin)
4. Hydroxylierung der δ-Amino- oder δ-Amid-Gruppe auf der Stufe des cyclischen Diglycyl-seryl-triornithins.

Nach Hydroxylamingaben zu Aspergillus viridi-nutans-Kulturen konnte in keinem Fall die Sideraminproduktion gesteigert werden (Abb. 25, 26). Diese Befunde machten eine Biosynthese von δ-N-Hydroxy-L-ornithin aus Glutaminsäure-ɣ-semi-aldehyd und Hydroxylamin unwahrscheinlich; eine Bestätigung dieses Befundes lieferten die Regulationsstudien der Sideraminproduktion durch Arginin in Gegenwart von Ornithin bzw. Glutaminsäure als Hauptstickstoffquellen. Arginin unterdrückt in Konzentrationen $\geqslant 10^{-4}$ M im Kulturmedium die Sideraminproduktion bei Glutaminsäure als N-Quelle, nicht jedoch bei Ornithin (Abb. 29, 30), da der Angriffspunkt des Feedback-Mechanismus vor Ornithin in der Biosynthesekette liegt.

Die Biosynthese des δ-N-Hydroxy-L-ornithins erfolgt somit höchstwahrscheinlich durch eine direkte Hydroxylierung der δ-Aminogruppe von Ornithin. Auf Ornithin als N-Quelle zeigte Aspergillus viridi-nutans eine sehr gute Sideraminproduktion (Abb. 27,28).

Ein direkter Beweis der Hydroxylierung der δ-Aminogruppe ließe sich durch Verwendung von ^{15}N in der δ-Aminogruppe mit anschließender massenspektroskopischer Bestimmung erbringen. Eine Hydroxylierung in einer Oxygenase-Reaktion durch molekularen Sauerstoff analog zur Hadacidinbiosynthese (STEVENS und EMERY, 1966) bzw. bei der Rhodotorulasäurebiosynthese (AKERS et al., 1972) könnte durch schweren Sauerstoff (^{18}O) nachgewiesen werden.

Gegen die Einführung der Hydroxygruppe in eine Amidbindung (δ-N-Acyl-L-ornithin) sprechen die Sideraminbiosynthesestudien bei Pilzen von ANKE und DIEKMANN (1973); in Einbauversuchen konnte gezeigt werden, daß δ-N-Hydroxy-L-ornithin Vorstufe bei allen Sideraminen vom Ferrichromtyp ist. ONG und EMERY (1972) konnten bei Ustilago sphaerogena eine δ-N-Hydroxy-L-ornithin:Acetyl-CoA δ-N-Transacetylase nachweisen. Hydroxylamin bzw. Ornithin werden durch das Enzym "nicht" acetyliert.
Eine Hydroxylierung des Stickstoffs nach Bildung der Amidbindung ist bei der Neoaspergillinsäure (MICETICH und MacDONALD, 1965) sowie bei der Pulcherriminsäure (UFFEN und CANALE-PAROLA, 1972; PLATTNER, 1976) beschrieben.
Eine Hydroxylierung der δ-Aminogruppe bzw. Amidgruppe von Ornithin auf der Stufe des cyclischen Hexapeptids konnte von EMERY (1974) ausgeschlossen werden, da weder Triglycyltriornithin noch das Triacetylderivat in Ferrichrom eingebaut wurden.

Bei der direkten Hydroxylierung der δ-Aminogruppe von Ornithin unterliegt die Sideraminproduktion Regulationseffekten der Ornithin-Biosynthese. Die Biosynthese von Ornithin bei Aspergillen wurde ausführlich bei Aspergillus nidulans (KINGHORN und PATEMAN, 1977) studiert (Abb. 35).
In Aspergillus nidulans sind Arginase und Ornithin-δ-Transaminase induzierbar durch Arginin (CYBIS und WEGLENSKI, 1972) und reprimierbar durch Ammonium und/oder Glucose (BARTNIK et al., 1973; BARTNIK und WEGLENSKI, 1974).

Aspergillus viridi-nutans zeigte bei Argininkonzentrationen $\geqslant 10^{-4}$ M eine Hemmung der Ornithinbiosynthese und damit der Sideraminproduktion (Abb. 29, 30). Bei Einbauversuchen von ^{14}C-Glutaminsäure in Desferri-Ferricrocin bei Argininkonzentrationen $\geqslant 10^{-4}$ M konnte unter den Versuchsbedingungen nur eine recht langsame Induktion der Arginase (nach minimal 6 h) festgestellt werden.

Bei Micrococcus glutamicus inhibiert Arginin in einem Feedback-Mechanismus die Phosphorylierung von N-Acetylglutaminsäure (UDAKA und KINOSHITA, 1958). Es ist nicht bekannt, welcher Enzymschritt in der Ornithinbiosynthesekette zwischen Glutaminsäure und Ornithin bei Aspergillus viridinutans durch Arginin in einem Feedback-Mechanismus gehemmt wird.

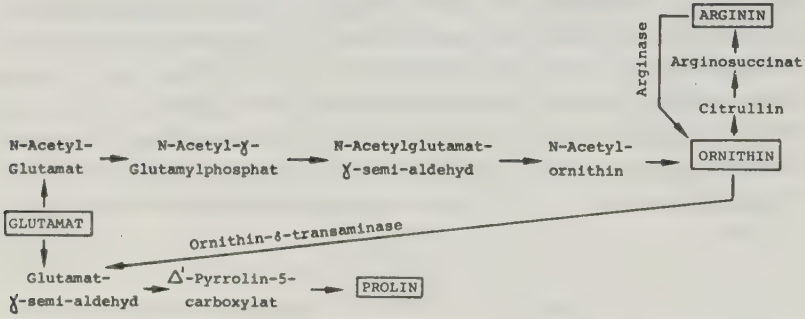


Abb. 35: Biosynthese von Ornithin, Arginin und Prolin

Zur Ausschaltung eventueller Argininеffekte auf die Sideraminbiosynthese unter den Desferri-Ferricrocin-Produktionsbedingungen bei Aspergillus viridi-nutans wäre die Verwendung von Mutanten mit aufgehobener Feedback-Hemmung durch Arginin, die durch ein Screening mit Argininantagonisten (NASS et al., 1971) gefunden werden können, zwar vorteilhaft, aber da die Arginase durch hohe Ammoniumkonzentrationen, wie sie bei einer optimalen Desferri-Ferricrocinproduktion meist vorliegen, gehemmt wird, ist ein Arginin-auxotropher Stamm (Mutation der Ornithin-carbamyl-transferase) zur Sideraminproduktion empfehlenswerter. Eine zusätzliche Verlustmutation der Ornithin-δ-transaminase würde ein Abfließen von Ornithin in Glutaminsäure-γ-semi-aldehyd ver-

hindern und damit sicherlich unter bestimmten Fermentationsbedingungen zu einer gesteigerten Sideraminbildungsgeschwindigkeit bei Aspergillus viridi-nutans führen.

D. TOXISCHE SEKUNDÄRMETABOLITE BEI ASPERGILLEN

Viele Mycotoxicosen werden durch Vertreter der Gattung Aspergillus hervorgerufen. Abb. 36 gibt einen Überblick über die wichtigsten Aspergillus-Mycotoxicosen (MOOS, 1977).

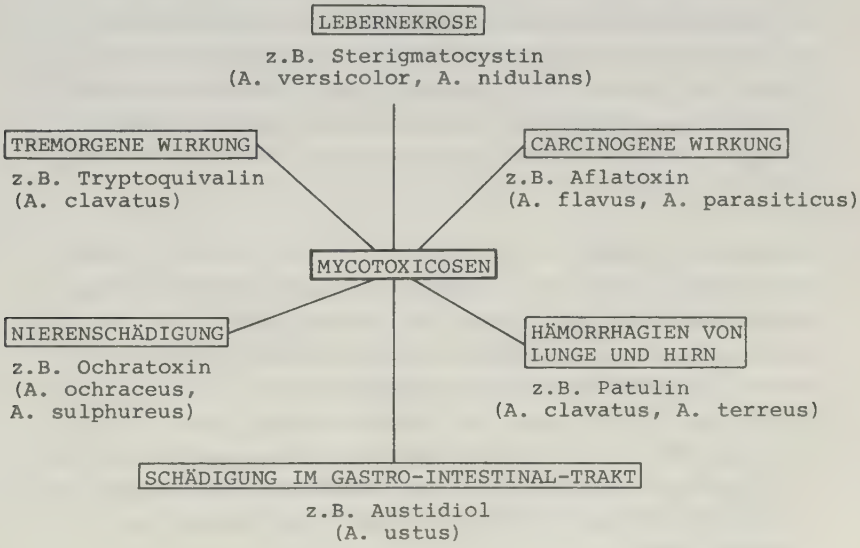


Abb. 36: Mycotoxicosen durch Aspergillen

Viele Aspergillen bilden z.B. Aflatoxin nicht nur auf komplexen Nährmedien in beachtlichen Mengen, sondern auch auf definierten Nährmedien mit Ammoniumacetat oder Asparagin als N-Quellen (REDDY, 1971), die auch im Normalmedium zur

Sideraminfermentation bei Aspergillus viridi-nutans Verwendung finden.

Bei Aspergillus viridi-nutans wurde das hochcancerogene Viriditoxin beschrieben (LILLEHOJ und CIEGLER, 1971; LILLEHOJ und MILBURN, 1973); es besitzt eine LD_{50} von 2,8 mg/kg in einer 20 g Maus. Viriditoxin zeigt antibiotische Eigenschaften z.B. gegen Bacillus brevis, Corynebacterium fascilans und Streptococcus faecalis.
Da sich bei den Aspergillen viele Mycotoxine vom Polyketidweg ableiten (MOOS, 1977; MAGGON et al., 1977), wurden die "Essigsäure-Feed-Batch-Kulturen" zur Desferri-Ferricrocinproduktion bei Aspergillus viridi-nutans näher auf antibiotische Nebenprodukte untersucht.
Auf dem variierten Normalmedium bildete der Pilz nur sporadisch geringe Mengen der antibiotisch wirksamen Substanz 4-Acetyl-6,8-dihydroxy-5-methyl-2-benzopyranon-1 (max. 10-20 mg/l); die Aktivität verschwand aber meist im Verlauf der Fermentation wieder.

Aspergillen bilden eine Vielfalt von Polyketiden (TURNER, 1971; MOOS, 1977). Bei der Optimierung der Desferri-Ferricrocinproduktion bei Aspergillus viridi-nutans muß stets eine eventuelle Mycotoxinproduktion berücksichtigt werden. Durch geeignete Kulturbedingungen läßt sich eine Mycotoxinproduktion jedoch meist sehr niedrig halten, wenn nicht sogar vollständig unterdrücken: so unterliegt z.B. die Aflatoxinproduktion teilweise einem Phosphateffekt (REDDY, 1971), wie er von vielen Antibiotikaproduktionen bekannt ist (MARTIN, 1977).

E. "OPTIMALER" PRODUKTIONSSTAMM

Nach den gewonnenen Erkenntnissen zur Regulation der Desferri-Ferricrocinbiosynthese bei Aspergillus viridi-nutans Ducker & Thrower müßte ein "optimaler" Produktionsstamm folgende Eigenschaften besitzen:

1. Mutation des Ferricrocinaufnahmesystems
2. Arginin-Auxotrophie (Mutation der Ornithin-carbamyltransferase)
3. Mutation der Ornithin-δ-transaminase
4. Mutation der α-Ketoglutaratdehydrogenase (bzw. Auxotrophie für Lysin)

Mit einem derartigen Produktionsstamm müßten Sideraminbildungsgeschwindigkeiten von weit mehr als 20 mg/l·h auf extrem billigen Normalmedien möglich sein.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Durch Feeding von Nährstoffen abhängig vom pH-Wert bzw. vom Sauerstoffpartialdruck in der Submerskultur konnten bei Aspergillus viridi-nutans Sideraminbildungsgeschwindigkeiten von max. 20 mg/l·h über mehrere Tage erreicht werden. Diese Feed-Batch-Verfahren ermöglichen Desferri-Ferricrocinausbeuten von mehr als 5 g/l.

Bei Aspergillus viridi-nutans liegt keine indirekte Regulation der Sideraminbiosynthese durch Eisen über verschiedene Stoffwechselaktivitäten bei unterschiedlichem Eisenangebot vor. Eine regulatorische Funktion von Ferricrocin selbst sowie die Bildung von Inhibitoren des Sideraminsynthetasesystems in Gegenwart von Eisen konnte ausgeschlossen werden.
Bei Aspergillus viridi-nutans war in Mycel, dessen Sideraminbiosynthese durch Eisen unterdrückt war, stets eine Hexapeptidsynthetaseaktivität in vitro nachweisbar.
Es gelang der Nachweis einer NADH:Ferricrocin-Oxidoreduktase sowohl in "eisenfreiem" Mycel als auch bei ausreichender Eisenversorgung.
Die Untersuchungen zur Regulation der Sideraminbildung durch Eisen sprechen in ihrer Gesamtheit für eine direkte Regulation eines oder mehrerer Enzyme der Sideraminbiosynthese durch Eisen - wahrscheinlich durch Fe(II).

Das spezifische Ferricrocinaufnahmesystem bei Aspergillus viridi-nutans unterliegt einer Regulation durch Eisen.

Die Biosynthese von δ-N-Hydroxy-L-ornithin erfolgt durch Hydroxylierung der δ-Aminogruppe von Ornithin. Arginin hemmt in Konzentrationen $\geqslant 10^{-4}$ M die Ornithin- und somit indirekt auch die Sideraminbiosynthese durch einen Feedback-Mechanismus.

Aspergillus viridi-nutans bildet unter den Desferri-Ferricrocinproduktionsbedingungen zeitweilig eine minimale anti-

biotische Aktivität gegen Bacillus subtilis und Saprolegnia asterophora, die aber nicht stabil ist und im Verlauf der Fermentation meist wieder verschwindet. Bei dem Antibiotikum handelt es sich um 4-Acetyl-6,8-dihydroxy-5-methyl-2-benzopyranon-1.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

AIBA, S., HUMPHREY, A.E., MILLIS, N.F.: Biochemical Engineering. New York - London: Academic Press 1973

AIBA, S., NAGAI, S., NISHIZAWA, Y.: Fed batch culture of Saccharomyces cerevisiae: A perspective of computer control to enhance the productivity in baker's yeast cultivation. Biotechnol. Bioeng. 18, 1001-1016 (1976)

AKERS, H.A., LLINÁS, M., NEILANDS, J.B.: Protonated amino acid precursor studies on rhodotorulic acid. Biosynthesis in deuterium oxide media. Biochemistry 11, 2283-2291 (1972)

ALDRIDGE, D.C., GROVE, J.F., TURNER, W.B.: 4-Acetyl-6,8-dihydroxy-5-methyl-2-benzopyran-1-one, a metabolite of Aspergillus viridi-nutans. J. Chem. Soc. (C), 126-129 (1966)

ALDERSON, T., SCOTT, B.R.: The photosensitising effect of 8-methoxypsoralen on the inactivation and mutation of Aspergillus conidia by near ultraviolet light. Mutat. Res. 9, 569-578 (1970)

ANKE, H., ANKE, T., DIEKMANN, H.: Biosynthesis of sideramines in fungi. Fusigen synthetase from extracts of Fusarium cubense. FEBS Lett. 36, 323-325 (1973)

ANKE, T., DIEKMANN, H.: Biosynthesis of sideramines in fungi. Rhodotorulic acid synthetase from extracts of Rhodotorula glutinis. FEBS Lett. 27, 259-262 (1972)

ANKE, T.: Versuche zur Synthese von Peptid- und Esterbindungen bei cyclischen Trihydroxamsäuren (Sideraminen) und Rhodotorulasäure bei Pilzen in vivo und in vitro. Dissertation Universität Tübingen (1973)

ANKE T., DIEKMANN, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 126. Mitteilung. Einbau von δ-N-Hydroxy-L-ornithin und δ-N-Acyl-δ-N-hydroxy-L-ornithinen in Sideramine von Pilzen. Arch. Microbiol. 95, 227-236 (1974)

ARCENEAUX, J.E.L., BYERS, B.R.: Ferric hydroxamate transport without subsequent iron utilisation in Bacillus megaterium. J. Bacteriol. 127, 1324-1330 (1976)

BARNEKOW, A., WINKELMANN, G., ZÄHNER, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 138. Mitteilung. Vergleichende Untersuchungen zum Eisentransport durch Sideramine an Knochenmarkzellen (Typ Detroit-98). Arch. Microbiol. 100, 329-340 (1974)

BARNEKOW, A., WINKELMANN, G.: Microbial iron chelates with iron donor properties in hemoglobin-synthesizing cells. Exp. Hemat. 4, 70-74 (1976)

BARTH, M.: Untersuchungen zum Stoffwechsel von Pilzen bei Eisenmangel. Diplomarbeit Universität Tübingen (1972)

BARTNIK, E., WEGLENSKI, P., PIOTROWSKA, M.: Ammonium and glucose repression of the arginine catabolic enzymes in Aspergillus nidulans. Mol. Gen. Genet. 126, 75-84 (1973)

BARTNIK, E., WEGLENSKI, P.: Regulation of arginine catabolism in Aspergillus nidulans. Nature 250, 590-592 (1974)

BERGMEYER, H.U., BERNT, E.: Bestimmung mit Glucose-Oxydase und Peroxydase. In: Methoden der enzymatischen Analyse (H.U. Bergmeyer, ed.), pp 1250-1259. Weinheim: Verlag Chemie 1974

BRAGG, P.D.: Nonheme iron in respiratory chains. In: Microbial iron metabolism (J.B. Neilands, ed.), pp 303-348. New York - London: Academic Press 1974

BRAUN, V., HANCOCK, R.E.W., HANTKE, K., HARTMANN, A.: Functional organization of the outer membrane of Escherichia coli: Phage and colicin receptors as components of iron uptake systems. J. Supramol. Struct. 5, 37-58 (1976)

BROWN, K.A., RATLEDGE, C.: Iron transport in Mycobacterium smegmatis: Ferrimycobactin reductase (NAD(P)H:Ferrimycobactin oxidoreductase), the enzyme releasing iron from its carrier. FEBS Lett. 53, 262-266 (1975)

BROT, N., GOODWIN, J.: Regulation of 2,3-dihydroxybenzoyl-serine synthetase by iron. J. Biol. Chem. 243, 510-513 (1968)

BULLEN, J.J., ROGERS, H.J., GRIFFITHS, E.: Bacterial iron metabolism in infection and immunity. In: Microbial iron metabolism (J.B. Neilands, ed.), pp 517-551. New York - London: Academic Press 1974

CLARK, J.M.: Experimental Biochemistry. San Francisco: W.H. Freeman and Company 1964

COCHRANE, V.W.: Glycolysis. In: The filamentous fungi, Vol.II (J.E. Smith, D.R. Berry, eds.), pp 65-91. London: Edward Arnold Publishers 1976

COHEN, B.L.: The proteases of Aspergilli. In: Genetics and physiology of Aspergillus (J.E. Smith, J.A. Pateman, eds.). pp 281-292. London - New York - San Francisco: Academic Press 1977

COVE, D.J.: The genetics of Aspergillus nidulans. In: Genetics and physiology of Aspergillus (J.E. Smith, J.A. Pateman, eds.), pp 81-95. London - New York - San Francisco: Academic Press 1977

CRUEGER, W.: Untersuchungen zur Sideramin-Biogenese. Dissertation Universität Tübingen (1968)

CRUEGER, W., ZÄHNER, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 70. Mitteilung. Über den Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die Sideraminbildung von Aspergillus melleus Yukawa. Arch. Mikrobiol. 63, 376-384 (1968)

CYBIS, J., WEGLENSKY, P.: Arginase induction in Aspergillus nidulans. The appearence and decay of the coding capacity of messenger. Eur. J. Biochem. 30, 262-268 (1972)

DAVID, C.N.: Ferritin and iron metabolism in Phycomyces. In: Microbial iron metabolism (J.B. Neilands, ed.), pp 149-158. New York - London: Academic Press 1974

DEMAIN, A.L.: Cellular and environmental factors affecting the synthesis and excretion of metabolites. J. Appl. Chem. Biotechnol. 22, 345-362 (1972 a)

DEMAIN, A.L.: Riboflavin oversynthesis. Annu. Rev. Microbiol. 26, 369-388 (1972 b)

DIEKMANN, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 81. Mitteilung. Vorkommen und Strukturen von Coprogen B und Dimerumsäure. Arch. Mikrobiol. 73, 65-76 (1970)

DIEKMANN, H.: Siderochromes (Iron(III)-trihydroxamates). In: CRC Handbook of Microbiology, Vol. III (R.C. West, A.I. Laskin, H.A. Lechevalier, eds.), pp 449-457. Cleveland: CRC Press 1973

DIEKMANN, H., KREZDORN, E.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 150. Mitteilung. Ferricrocin, Triacetylfusigen und andere Sideramine aus Pilzen der Gattung Aspergillus, Gruppe Fumigatus. Arch. Microbiol. 106, 191-194 (1975)

DULANEY, E.L., GRAY, R.A.: Penicillia that make N-formylhydroxyaminoacetic acid, a new fungal product. Mycologia 54, 476-480 (1962)

DULANEY, E.L. Further studies on formation of N-formylhydroxyaminoacetic acid by Penicillium. Mycologia 55, 211-220 (1963)

EBERLE-HAEGI, R.M.: Über die Bildung von Ferrichrysin, einem Sideramin aus Aspergillus melleus Yukawa, und ihre Verknüpfung mit dem Intermediärstoffwechsel. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 76, 279-305 (1966)

EDWARDS, J.H., AL-ZUBAIDY, T.S.: Medical aspects of Aspergillus. In: Genetics and physiology of Aspergillus (J.E. Smith, J.A. Pateman, eds.), pp 525-538. London - New York - San Francisco: Academic Press 1977

EMERY, T.: Isolation, characterization, and properties of fusarinine, a δ-hydroxamic acid derivative of ornithine. Biochemistry 4, 1410-1417 (1965)

EMERY, T.: Role of ferrichrome as a ferric ionophore in Ustilago sphaerogena. Biochemistry 10, 1483-1488 (1971 a)

EMERY, T.: Hydroxamic acids of natural origin. Adv. Enzym. 35, 135-185 (1971 b)

EMERY, T.: Biosynthesis and mechanism of action of hydroxamate-type siderochromes. In: Microbial iron metabolism (J.B. Neilands, ed.), pp 107-123. New York - London: Academic Press 1974

EMERY, T.: Fungal ornithine esterases: Relationship to iron transport. Biochemistry 15, 2723-2728 (1976)

ERNST, J.F.: Zur Bedeutung der Cytoplasmamembran für die Sideramin-Eisenaufnahme bei Neurospora crassa. Dissertation Universität Tübingen (1976)

ERNST, J.F., WINKELMANN, G.: An attempt to localize iron-chelate binding sites on cytoplasmatic membranes of fungi. FEBS Lett. 76, 71-76 (1977 a)

ERNST, J.F., WINKELMANN, G.: Enzymatic release of iron from sideramines in fungi. NADH:Sideramine oxidoreductase in Neurospora crassa. Biochim. Biophys. Acta 500, 27-41 (1977 b)

FIECHTER, A., VON MEYENBURG, K.: Automatic analysis of gas exchange in microbial systems. Biotechnol. Bioeng. X, 535-549 (1968)

FIEDLER, H.-P., SAUERBIER, J.: Metabolic products of microorganisms. 165. Isolation and quantitative determination of siderochromes. Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 5, 51-57 (1978)

FROST, G.E., ROSENBERG, H.: Relationship between the ton B locus and iron transport in Escherichia coli. J. Bacteriol. 124, 704-712 (1975)

GALBRAITH, J.C., SMITH, J.E.: Changes in activity of certain enzymes of the tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate cycle during the initiation of conidiation of Aspergillus niger. Can. J. Microbiol. 15, 1207-1212 (1969)

HANCOCK, R.E.W., BRAUN, V.: The colicin I receptor of Escherichia coli K-12 has a role in enterochelin-mediated iron transport. FEBS Lett. 65, 208-210 (1976)

HANCOCK, R.E.W., HANTKE, K., BRAUN, V.: Iron transport in Escherichia coli K-12: Involvement of the colicin B receptor and of a citrate-inducible protein. J. Bacteriol. 127, 1370-1375 (1976)

HANCOCK, R.E.W., HANTKE, K., BRAUN, V.: Iron transport in Escherichia coli K-12. 2,3-Dihydroxybenzoate-promoted iron uptake. Arch. Microbiol. 114, 231-239 (1977)

HANTKE, K., BRAUN, V.: Membrane receptor dependent iron transport in Escherichia coli. FEBS Lett. 49, 301-305 (1975 a)

HANTKE, K., BRAUN, V.: A function common to iron-enterochelin transport and action of colicins B, I, V in Escherichia coli. FEBS Lett. 59, 277-281 (1975 b)

HASENBÖHLER, A.: Instrumentierung von Fermentationsanlagen. Dissertation Universität Tübingen (1978)

HOLZ, G., BERGMEYER, H.U.: Bestimmung mit Acetatkinase und Hydroxylamin. In: Methoden der enzymatischen Analyse (H.U. Bergmeyer, ed.), pp 1574-1578. Weinheim: Verlag Chemie 1974

KACZKA, E.A., GITTERMAN, C.O., DULANEY, E.L., FOLKERS, K.: Hadacidin, a new growth-inhibitory substance in human tumor systems. Biochemistry 1, 340-343 (1962)

KELLER-SCHIERLEIN, W., PRELOG, V., ZÄHNER, H.: Siderochrome. (Natürliche Eisen(III)-trihydroxamat-Komplexe.) Fortschr. Chem. Org. Naturst. XXII, 279-322 (1964)

KINGHORN, J.R., PATEMAN, J.A.: Nitrogen metabolism. In: Genetics and physiology of Aspergillus (J.E. Smith, J.A. Pateman, eds.), pp 147-202. London - New York - San Francisco: Academic Press 1977

KURAHASHI, K.: Biosynthesis of small peptides. Annu. Rev. Biochem. 43, 445-459 (1974)

LEONG, J., NEILANDS, J.B., RAYMOND, K.N.: Coordination isomers of biological iron transport compounds. III. Transport of Λ-cis-chromic desferriferrichrome bei Ustilago sphaerogena. Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 1066-1071 (1974)

LEONG, J., NEILANDS, J.B.: Mechanisms of siderophore iron transport in enteric bacteria. J. Bacteriol. 126, 823-830 (1976)

LILLEHOJ, E.B., CIEGLER, A.: A toxic substance from Aspergillus viridi-nutans. Can. J. Microbiol. 18, 193-197 (1972)

LILLEHOJ, E.B., MILBURN, M.S.: Viriditoxin production by Aspergillus viridi-nutans and related species. Appl. Microbiol. 26, 202-205 (1973)

LLINÀS, M., KLEIN, M.P., NEILANDS, J.B.: Solution conformation of ferrichrome, a microbial iron transport cyclohexapeptide, as deduced by high resolution proton magnetic resonance. J. Mol. Biol. 52, 399-414 (1970)

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

MAGGON, K.K., GUPTA, S.K., VENKITASUBRAMANIAN, T.A.: Biosynthesis of aflatoxins. Bacteriol. Rev. 41, 822-855 (1977)

MAGNUSSON, K.-E., EDEBO, L.: Influence of cell concentration, temperature, and press performance on flow characteristics and disintegration in the freeze-pressing of Saccharomyces cerevisiae with the X-press. Biotechnol. Bioeng. XVIII, 865-883 (1976)

MARTIN, J.M.: Control of antibiotic synthesis by phosphate. Adv. Biochem. Eng. 6, 105-127 (1977)

MAYHEW, S.G., LUDWIG, M.L.: Flavodoxins and electron-transferring flavoproteins. In: The Enzymes, Vol. XII B (P.D. Boyer, ed.), pp 57-118. New York - San Francisco - London: Academic Press 1975

McCULLOUGH, W., PAYTON, M.A., ROBERTS, C.F.: Carbon metabolism in Aspergillus nidulans. In: Genetics and physiology of Aspergillus (J.E. Smith, J.A. Pateman, eds.), pp 97-129. London - New York - San Francisco: Academic Press 1977

MERCK: Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie. Informationsschrift der Fa. Merck, Darmstadt (1970)

MICETICH, R.G., MacDONALD, J.C.: Biosynthesis of neoaspergillic and neohydroxyaspergillic acids. J. Biol. Chem. 240, 1692-1695 (1965)

MOOS, M.O.: Aspergillus mycotoxins. In: Genetics and physiology of Aspergillus (J.E. Smith, J.A. Pateman, eds.), pp 499-524. London - New York - San Francisco: Academic Press 1977

MÜLLER, H.-G.: Untersuchung der Biosynthese des cyclischen Esters Fusigen mit Protoplasten und zellfreien Extrakten von Fusarium cubense und Versuche zur Synthese von Hexapeptidsideraminen in vivo und in vitro. Dissertation Universität Tübingen (1976)

MÜLLER, H.-G. DIEKMANN, H.: Einbau von Glycin und Serin in Sideramine vom Ferrichrom-Typ bei Pilzen der Gattung Aspergillus in vivo und in vitro. Arch. Microbiol. 113, 243-246 (1977)

NASS, G., PORALLA, K., ZÄHNER, H.: Biogenetic amino acid antagonists. Naturwissenschaften 58, 603-610 (1971)

NEILANDS, J.B.: Microbial iron transport compounds (Siderochromes). In: Inorganic Biochemistry, Vol. I (G. Eichhorn, ed.), pp 167-202. Amsterdam - London - New York: Elsevier Scientific Publishing Company 1973

NISHIO, N., TSUCHIYA, Y., HAYASHI, M., NAGAI, S.: A fed-batch culture of methanol-utilizing bacteria with pH stat. J. Ferment. Technol. 55, 151-155 (1977)

O'BRIEN, I.G., COX, G.B., GIBSON, F.: Enterochelin hydrolysis and iron metabolism in Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 237, 537-549 (1971)

ONG, D.E., EMERY, T.F.: Ferrichrome biosynthesis: Enzyme catalyzed formation of the hydroxamic acid group. Arch. Biochem. Biophys. 148, 77-83 (1972)

PAN, C.H., HEPLER, L., ELANDER, R.P.: Control of pH and carbohydrate addition in the penicillin fermentation. Dev. Ind. Microbiol. 13, 103-112 (1972)

PATEMAN, J.A., KINGHORN, J.R.: Nitrogen Metabolism. In: The filamentous fungi, Vol. II (J.E. Smith, D.R. Berry, eds.), pp 159-237. London: Edward Arnold Publishers 1976

PERLMAN, D., BODANSKY, M.: Biosynthesis of peptide antibiotics. Annu. Rev. Biochem. 40, 449-464 (1971)

PIENIAZEK, N.J., BAL, J., BALBIN, E., STEPIEN, P.: An Aspergillus nidulans mutant lacking serine transacetylase: Evidence for two pathways of cysteine biosynthesis. Mol. Gen. Genet. 132, 363-366 (1974)

PIRT, S.J.: The theory of fed batch culture with reference to the penicillin fermentation. J. Appl. Chem. Biotechnol. 24, 415-424 (1974)

PLATTNER, H., DIEKMANN, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 124. Mitteilung. Einbau von L-Leucin in cyclo-L-Leucyl-L-leucyl, dem Intermediärprodukt der Biosynthese von Pulcherriminsäure, in zellfreien Extrakten von Candida pulcherrima. Arch. Mikrobiol. 93, 363-365 (1973)

PLATTNER, H.: Untersuchung der Biosynthese von Pulcherriminsäure in zellfreien Extrakten von Candida pulcherrima. Dissertation Universität Tübingen (1976)

PORRA, R.J., LANGMAN, L., YOUNG, I.G., GIBSON, F.: The role of ferric enterochelin esterase in enterochelin-mediated iron transport and ferrochelatase activity in Escherichia coli. Arch. Biochem. Biophys. 153, 74-78 (1972)

PUGSLEY, A.P., REEVES, P.: Uptake of ferrienterochelin by Escherichia coli: Energy-dependent stage of uptake. J. Bacteriol. 130, 26-36 (1977 a)

PUGSLEY, A.P., REEVES, P.: The role of colicin receptors in the uptake of ferrienterochelin by Escherichia coli K-12. Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 903-911 (1977 b)

RAISTRICK, H., RUDMAN, P.: Studies in the biochemistry of microorganisms. 97. Flavipin, a crystalline metabolite of Aspergillus flavipes (Bainier & Sartory) Thom & Church and Aspergillus terreus Thom. Biochem. J. 63, 395-406 (1956)

REDDY, T.V., VISWANATHAN, L., VENKITASUBRAMANIAN, T.A.: High aflatoxin production on a chemically defined medium. Appl. Microbiol. 22, 393-396 (1971)

REUSS, M., PIEHL, H., WAGNER, F.: Application of mass spectrometry to the measurement of dissolved gases and volatile substances in fermentation. Fifth international fermentation symposium - Abstracts of papers (H. Dellweg, ed.), p. 25. Berlin 1976

RODGERS, G.C., NEILANDS, J.B.: Microbial iron transport compounds. In: CRC Handbook of Microbiology, Vol. II (A.I. Laskin, H.A. Lechevalier, eds.), pp 823-830. Cleveland: CRC Press 1973

ROGERS, S., NEILANDS, J.B.: The α-amino-ω-hydroxamino acids. Biochemistry 2, 6-9 (1963)

SCOTT, B.R., ALDERSON, T.: The random (non-specific) forward mutational response of gene loci in Aspergillus conidia after photosensitisation to near ultraviolet light (365 nm) by 8-methoxypsoralen. Mutat. Res. 12, 29-34 (1971)

SHIGEURA, H.T., GORDON, C.N.: The mechanism of action of hadacidin. J. Biol. Chem. 237, 1937-1940 (1962)

SNOW, G.A.: Mycobactins: Iron-chelating growth factors from Mycobacteria. Bacteriol. Rev. 34, 99-125 (1970)

SOJKA, G.A., GARNER, H.R.: The serine biosynthetic pathway in Neurospora crassa. Biochim. Biophys. Acta 148, 42-47 (1967)

STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie. (2. Auflage). Berlin - Heidelberg - New York: Springer-Verlag 1967

STEVENS, R.L., EMERY, T.F.: The biosynthesis of hadacidin. Biochemistry 5, 74-81 (1966)

TSAO, G.T., LEE, Y.H.: Aeration. In: Annual reports on fermentation processes. Vol. I (D. Perlman, ed.), pp 115-149. New York - San Francisco - London: Academic Press 1977

TURNER, W.B.: Fungal metabolites. London - New York: Academic Press 1971

UDAKA, S., KINOSHITA, S.: Studies on L-ornithine fermentation. II. The change of fermentation product by a feedback type mechanism. J. Gen. Appl. Microbiol. 4, 283-288 (1958)

UFFEN, R.L., CANALE-PAROLA, E.: Synthesis of pulcherriminic acid by Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 111, 86-93 (1972)

WAYNE, R., NEILANDS, J.B.: Evidence for common binding sites for ferrichrome compounds and bacteriophage Ø80 in the cell envelope of Escherichia coli. J. Bacteriol. 121, 497-503 (1975)

WEINBERG, E.D.: Iron and susceptibility to infectious disease. Science 184, 952-956 (1974)

WIEBE, C., WINKELMANN, G.: Kinetic studies on the specificity of chelate-iron uptake in Aspergillus. J. Bacteriol. 123, 837-842 (1975)

WINKELMANN, G., BARNEKOW, A., ILGNER, D., ZÄHNER, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 120. Mitteilung. Eisenaufnahme bei Neurospora crassa. II. Regulation der Sideraminbildung und Inhibition des Eisentransportes durch Metallanaloge des Coprogens. Arch. Mikrobiol. 92, 285-300 (1973)

WINKELMANN, G., ZÄHNER, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 115. Mitteilung. Eisenaufnahme bei Neurospora crassa. I. Zur Spezifität des Eisentransportes. Arch. Mikrobiol. 88, 49-60 (1973)

WINKELMANN, G.: Metabolic products of microorganisms. 132. Uptake of iron by Neurospora crassa. III. Iron transport studies with ferrichrome-type compounds. Arch. Microbiol. 98, 39-50 (1974)

YAGI, H., YOSHIDA, F.: Oxygen absorption in fermenters - effects of surfactants, antifoaming agents, and sterilized cells. J. Ferment. Technol. 52, 905-916 (1974)

YAMANAKA, T., OKUNUKI, K.,: Cytochromes. In: Microbial iron metabolism (J. B. Neilands, ed.), pp 349-400. New York - London: Academic Press 1974

YAMANÉ, T., TSUKANO, M.: Effect of several substrate-feeding modes on production of extracellular β-amylase by fed-batch culture of Bacillus megaterium. J. Ferment. Technol. 55, 233-242 (1977)

YOUNG, I.G., GIBSON, F.: Regulation of the enzymes involved in the biosynthesis of 2,3-dihydroxybenzoic acid in Aerobacter aerogenes and Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 177, 401-411 (1969)

ZÄHNER, H., BACHMANN, E., HÜTTER, R., NÜESCH, J.: Sideramine, eisenhaltige Wachstumsfaktoren aus Mikroorganismen. Pathol. Microbiol. 25, 708-736 (1962)

ZÄHNER, H., KELLER-SCHIERLEIN, W., HÜTTER, R., HESS-LEISINGER, K., DEER, A.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 40. Mitteilung. Sideramine aus Aspergillaceen. Arch. Mikrobiol. 45, 119-135 (1963)

ZÄHNER, H., MAAS, K.: Biology of antibiotics. New York - Heidelberg - Berlin: Springer-Verlag 1972

ZÄHNER, H., DIDDENS, H., KELLER-SCHIERLEIN, W., NÄGELI, H.-U.: Some experiments with semisynthetic sideromycins. J. Antibiot. XXX, 201-206 (1977)

Lebenslauf

7.4. 1949	geboren in Neustadt an der Weinstraße
1956-1964	Grundschule in Mußbach an der Weinstraße
1964-1969	Privates staatlich anerkanntes Aufbaugymnasium der Pfälzischen Landeskirche in Annweiler am Trifels
16.6. 1969	Reifeprüfung
ab WS 69/70	Biochemiestudium an der Universität Tübingen
25.9. 1970	1. Teil des Vordiploms in Biochemie
ab WS 70/71	Zweitimmatrikulation in Biologie an der Universität Tübingen
15.10.1972	2. Teil des Vordiploms in Biochemie
5. 4.1976	Diplom in Biologie
12. 7.1976	Eheschließung mit Ines Stonner
28. 2.1977	Diplom in Biochemie Anfertigung der Dissertation bei Prof. Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, der Universität Tübingen
ab Okt. 1977	wissenschaftlicher Angestellter bei Prof. Dr. H. Zähner

Meine akademischen Lehrer waren:

E. Bayer, F.-W. Bentrup, V. Braun, E. Bünning, H. Diekmann,
U. Feine, L. Flohé, A. Gottschalk, K.G. Grell, J. Guglielmi,
W. Harder, E. Kallee, W. Kraus, H. Krüger, H. Mauser, D. Mecke,
H. Metzner, G.F. Meyer, K. Mörike, E. Müller, H. Pape,
H. Probst, W. Rüdorff, E.M. Sander, W. Schweizer, V. Schwartz,
B. Schwemmle, W. Seyffert, H. Suhr, G. Weitzel, U. Weser,
H. Zähner, K. Zetsche